

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ  
SETOR PALOTINA  
CURSO DE TECNOLOGIA EM BIOTECNOLOGIA

**TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO**  
ÁREA: Microbiologia do Solo

Aluna: Kamila Kock  
Supervisor: Dr.<sup>a</sup> Diva de Souza Andrade  
Orientadora: Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Luciana Grange

Trabalho de conclusão de curso  
apresentado como requisito parcial para  
a conclusão do CURSO DE  
GRADUAÇÃO DE TECNOLOGIA  
EM BIOTECNOLOGIA.

PALOTINA-PR  
Dezembro de 2014

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ  
SETOR PALOTINA  
CURSO DE TECNOLOGIA EM BIOTECNOLOGIA

**DIVERSIDADE MORFOLÓGICA E GENÉTICA DE *Bacillus*  
spp. OBTIDAS DE SOLOS SOB DIFERENTES SISTEMAS DE  
CULTIVO E NATURAL**

Aluno: Kamila Kock  
Supervisor: Dr.<sup>a</sup> Diva de Souza Andrade  
Orientadora: Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Luciana Grange

Trabalho de conclusão de curso  
apresentado como requisito parcial para  
a conclusão do CURSO DE  
GRADUAÇÃO DE TECNOLOGIA  
EM BIOTECNOLOGIA.

PALOTINA-PR  
Dezembro de 2014

## FOLHA DE APROVAÇÃO

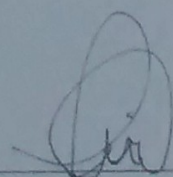
Universidade Federal do Paraná  
Setor Palotina  
Curso de Tecnologia em Biotecnologia

Trabalho de Conclusão de Curso  
Área de estágio: Microbiologia do Solo  
Acadêmico: Kamila Kock  
Supervisora do Estágio: Dr<sup>a</sup>. Diva de Souza Andrade  
Orientadora do Estágio: Dr<sup>a</sup>. Luciana Grange

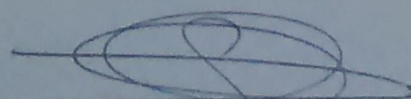
Trabalho de conclusão de curso apresentado como requisito parcial para aprovação na disciplina de Estágio Supervisionado Obrigatório do Curso Superior de Tecnologia Em Biotecnologia para a seguinte banca examinadora:



Dr. Marco Antonio Barcellar Barreiros



Msc. Fernanda Freitas de Oliveira



Dr<sup>a</sup>. Luciana Grange  
Orientadora

Palotina-PR, 05 de dezembro de 2014.

*“Saber esperar é uma virtude! Aceitar, sem questionar, que cada coisa tem um tempo certo para acontecer... É ter fé!”*

**- A espera de um Milagre**

*“Não escute as pessoas negativas. Junte-se a quem enxerga a vida com bons olhos. Alie-se aos que lhe amam de verdade e que curtem seu sucesso.”*

**- Desconhecido**

## AGRADECIMENTOS

À minha orientadora, Prof. Dra. Luciana Grange, pelo carinho e confiança depositados durante toda a graduação, me auxiliando nos mais diversos problemas enfrentados ao longo do curso.

Ao Prof. Dr. Marco Antonio Bacellar Barreiros, pelo auxílio prestado nas análises estatísticas e na montagem dos dendogramas.

À Dra. Diva de Souza Andrade, por disponibilizar o espaço no laboratório de Microbiologia do Solo - IAPAR, e todo o material necessário para que eu pudesse realizar minha pesquisa.

Agradeço também a todos os colegas de laboratório do IAPAR, em especial à Kelly e a Nahyara, que me auxiliaram durante a pesquisa, tornando-nos amigas que levarei para o resto da vida.

Aos meus colegas do Grupo de Pesquisa em Fixação Biológica de Nitrogênio (FIXTEC): André, Andressa, Silvia, Thais, Everton, Emerson, Andrea e Walkyria pelos ensinamentos no laboratório.

Aos meus amigos Lucas e Angélica por me aguentarem durante a graduação, tornando-a mais fácil e divertida.

À Amanda por me fazer companhia durante o estágio, tornando a distância da família mais fácil.

Ao Antônio Ronaldo, pela paciência que teve durante a graduação, me apoiando e incentivando a sempre fazer o meu melhor.

Às minhas grandes amigas, Letícia, Luana, Mariana, Deysi, Jéssica e Juliane, por estarem ao meu lado durante toda a minha trajetória de vida, através de conversas, festas e comilanças.

Aos meus avós, Trineli e Natalício, que são como pais para mim, estando sempre ao meu lado em todos os momentos. Aos meus tios e primos, pelos momentos prazerosos em família, pelo incentivo e apoio.

À minha mãe Sirlei, por ser essa pessoa batalhadora que nunca abaixou a cabeça para as adversidades que vida lhe trouxe, que teve que aprender a ser pai e mãe, me ensinando com muito amor a ser uma pessoa de valores. Mãe, você é minha heroína e meu espelho, espero algum dia ser igual você.

Ao meu pai, que foi embora muito cedo, mas sei que aonde quer que ele esteja, está olhando por mim.

À Deus, por nunca me desamparar, sempre me proteger e atender minhas orações, e por colocar todas essas pessoas no meu caminho e me mostrar a importância de cada uma delas.

## SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS.....	viii
LISTA DE TABELAS.....	ix
LISTA DE ABREVIACÕES.....	x
RESUMO.....	xi
1 INTRODUÇÃO .....	1
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....	3
2.1 RIZOBACTÉRIAS PROMOTORAS DE CRESCIMENTO DE PLANTAS .....	3
2.2 <i>Bacillus</i> spp. NO CONTROLE BIOLÓGICO DE FITOPATÓGENOS .....	4
2.3 DIVERSIDADE DE <i>Bacillus</i> spp. NO SOLO. ....	7
2.4 FERRAMENTAS NO ESTUDO DA DIVERSIDADE DE MICRO-ORGANISMOS.....	8
3 OBJETIVO GERAL .....	11
3.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	11
4 MATERIAL E MÉTODOS .....	12
4.1 LOCAL DA PESQUISA .....	12
4.2 COLETA DOS SOLOS.....	12
4.3 SELEÇÃO DE ISOLADOS DE <i>Bacillus</i> spp. ....	15
4.4 QUANTIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICAS DOS ISOLADOS DE <i>Bacillus</i> spp. ....	15
4.5 CARACTERIZAÇÃO GENÉTICA.....	16
4.5.1 Extração de DNA.....	16
4.5.2 Amplificação do DNA por PCR utilizando primers para regiões intergênica 16S-23S do rRNA.....	17
4.5.3 Restrição por ARDRA-PCR .....	18
4.5.4 Análise de agrupamento dos produtos obtidos por ARDRA-PCR .....	19
5 RESULTADOS E DISCUSSÕES .....	20
5.1 TIPAGEM MORFOLÓGICA DOS ISOLADOS .....	20
5.2 ANÁLISE DE AGRUPAMENTO DOS PRODUTOS OBTIDOS POR ARDRA-PCR.....	25
5.3 ANÁLISE DE AGRUPAMENTO DE ARDRA-MORFO .....	28
6 CONCLUSÕES .....	31
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	32
ANEXOS	

## LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1: Locais de coleta dos solos. Fonte: Google Maps. ....	12
FIGURA 2. Distribuição estatística dos pontos de coleta de solo referentes às sub-amostras por repetição em relação à gleba (tipo de manejo), utilizados para obtenção dos isolados. ....	13
FIGURA 3: Perfil eletroforético de restrição da região ITS com a enzima <i>Nde</i> I. ....	26
FIGURA 4: Perfil eletroforético de restrição da região ITS com a enzima <i>Nde</i> I e <i>Eco</i> RI. ...	26
FIGURA 5: Perfil eletroforético de restrição da região ITS com a enzima <i>Eco</i> RI e <i>Pst</i> I. ....	26
FIGURA 6: Perfil eletroforético de restrição da região ITS com a enzima <i>Pst</i> I. ....	27



## LISTA DE TABELAS

TABELA 1: Pontos de coleta das sub-amostras por repetição de acordo com cada tipo de manejo, obtidas por Global Positioning System (GPS). .....	14
TABELA 2: Unidades Formadoras de Colônias (u.f.c) por manejo de cultivo .....	20
TABELA 3: Distribuição dos isolados provenientes de áreas sob diferentes manejos, segundo a classificação em grupos (G) da tipagem obtida pela análise das características morfológicas segundo Fonseca et al. (2000). .....	23
TABELA 4: Distribuição dos isolados provenientes de áreas sob diferentes manejos, segundo a classificação em grupos (G) obtida pela análise ARDRA-PCR.....	27
TABELA 5: Distribuição dos isolados provenientes de áreas sob diferentes manejos, segundo a classificação em grupos (G) obtida pelos perfis de ARDRA-PCR e características morfológicas.....	29
TABELA 6: Índices de diversidade, estimados pela tipagem morfológica e genética de isolados obtidos de solos de diferentes manejos de cultivo. ....	30

## LISTA DE ABREVIACÕES

AFLP - *Amplified Fragment Length Polymorphism*

AP-PCR - *Arbitrarily primed-PCR*

ARDRA - *Amplified Ribosomal DNA Restriction Analysis*

BPCP - Bactérias Promotoras de Crescimento de Plantas

Bt - *Bacillus thuringiensis*

BSA - *Bovine Serum Albumin*

CBM - Carbono da Biomassa Microbiana

DGGE - *Denaturing Gradient Gel Electrophoresis*

DNA - Ácido Desoxirribonucleico

ERIC - *Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus*

GPS - *Global Positioning System*

IAPAR - Instituto Agronômico do Paraná

IGS - *Intergene Sequences*

ITS - *Internal Transcribed Spacer*

MCR - Marechal Cândido Rondon

NaCl – Cloreto de Sódio

PCR - *Polymerase Chain Reaction* – Reação em Cadeia da Polimerase

PCR-SSCP - *Single-Strand-Conformation Polymorphism*

PGPR - Rizobactérias Promotoras de Crescimento de Plantas

RAPD - *Random Amplified Polymorphic DNA*

REP - *Repetitive Extragenic Palindromic*

rep-PCR - *repetitive-sequence-based-PCR*

rRNA - ácidos ribonucleicos ribossomais

SDS - *Sodium Dodecyl Sulphate*

TE – Tris EDTA

TGGE - *Temperature Gradient Gel Electrophoresis*

U.F.C - Unidades Formadoras de Colônias

UV - Ultravioleta

## RESUMO

O solo é o habitat de uma grande variedade de micro-organismos, dentre eles estão as rizobactérias promotoras de crescimento de plantas (PGPR) que são bactérias que habitam a rizosfera, região do solo que sofre influência das raízes. Elas podem aumentar o crescimento de plantas por promoverem a solubilização de fosfatos minerais, fixação biológica de nitrogênio e produção de hormônios de crescimento, como auxinas e giberelina. Além disso, são importantes agentes de biocontrole, pela produção de compostos de baixo peso molecular, como a  $\beta$ -1,3-glucanase, quitinases, antibióticos, ácido cianídrico e sideróforos. Diversos gêneros de micro-organismos vêm sendo estudados quanto à capacidade de promover crescimento, entre eles destaca-se o *Bacillus* spp., principalmente os entomopatogênicos, que possuem a capacidade de produzir endósporos e toxinas, importantes no controle de pragas agrícolas. Para aplicar com sucesso tais agentes, é necessário um grande entendimento de sua ecologia. Um maior conhecimento em relação à diversidade, distribuição e atividades de rizobactérias é de extrema importância para a identificação de novas linhagens, para a formulação de inoculantes estáveis de alta qualidade e prazo de vida adequado. A utilização de um único método de caracterização, seja ele fenotípico ou genotípico, não é o suficientemente preciso para a caracterização de um organismo, mas o emprego conjunto das técnicas clássicas e moleculares desempenha um papel fundamental na identificação de espécies. Neste contexto, o presente trabalho tem como objetivo isolar e caracterizar morfológica e geneticamente bactérias do gênero *Bacillus* spp., nativas de solo de diferentes manejos de cultivo e sistema natural da região oeste do estado do Paraná, visando o reconhecimento de novas estirpes com potencial para agente de biocontrole. Foram avaliados seis diferentes manejos, sendo eles o plantio direto (M1), horticultura (M2), pastagem (M3), sistema agropastoril (M4), mata nativa (M5) e plantio convencional (M6), obtendo um total de 208 isolados, sendo que o manejo com horticultura (M2) apresentou o maior número de representantes. Na caracterização morfológica e genética, utilizando técnica de ARDRA da região intergênica 16S-23S do rDNA, o manejo agropastoril (M4) foi o que apresentou a maior diversidade, seguido de perto pela mata nativa (M5) e o manejo horticultura (M2). O índice de diversidade de Shannon e Simpson também apontou o sistema agropastoril (M4) como o de maior diversidade de *Bacillus* spp.

**Palavras-chave:** *Bacillus*, controle biológico, BPCPs, micro-organismos, ARDRA.

## 1 INTRODUÇÃO

O crescimento da agricultura brasileira teve início na década de 60 e 70, com o desenvolvimento do setor através implementação de programas governamentais orientados pelos princípios modernizantes da Revolução Verde, rompendo com práticas ultrapassadas e adotando novas formas de produção (CAMPANHOLA e BETTIOL, 2003; FERREIRA et al., 2009). Esse programa surgiu com o propósito de aumentar a produção agrícola através do desenvolvimento de pesquisas em sementes, fertilização do solo e utilização de máquinas no campo que aumentassem a produtividade. Entre os principais mecanismos utilizados pelo Estado para a modernização da agricultura estão o investimento público em infraestrutura; estabelecimento de projetos especiais e programas regionais; desenvolvimento da agroindústria; reestruturação da pesquisa agropecuária e da extensão rural; incremento do crédito rural; subsídios para a aquisição de insumos modernos (ALENCAR, 2000).

Apesar dos benefícios trazidos pela modernização agrícola, muitos problemas foram observados devido à falta de conhecimento sobre os impactos ambientais causados aos ecossistemas, como a contaminação do solo e da água, e o surgimento de resistência de doenças e pragas, através do uso exagerado de defensivos agrícolas e fertilizantes químicos. Esses problemas contribuem para o desequilíbrio biológico, como a perda da biodiversidade de micro-organismos benéficos, principalmente nos ciclos biogeoquímicos e na promoção de crescimento vegetal (MORANDI e BETTIOL, 2009). Portanto, para garantir a viabilidade da comunidade biótica é essencial conservar a qualidade do solo.

Diversos métodos vêm sendo utilizados a fim de manter a qualidade dos solos cultivado e naturais, entre eles está o uso de micro-organismos em bioprodutos, mas a sua utilização exige a identificação e caracterização das estirpes. Vários métodos moleculares foram desenvolvidos a partir da década de 90, possibilitando a identificação de um número cada vez maior de micro-organismos (WIDMER *et al.*, 1998), contribuindo para o avanço da caracterização da diversidade presente no solo e em outros substratos (SILVA *et al.*, 2003; JONES e THIES, 2007; MILETTO *et al.*, 2007; ZHANG *et al.*, 2007).

O solo é um habitat com enorme variabilidade de micro-organismos, vegetais (microflora) e animais das mais variadas dimensões. Dentre os principais micro-organismos presentes neste habitat de extrema importância, estão as rizobactérias: indivíduos que habitam a região do solo que sofre influência das raízes, chamada rizosfera, podendo ser classificados como patógenos, neutros e benéficos, de acordo com os efeitos causados nas plantas

(DOBBELAERE *et al.*, 2003). As bactérias benéficas, conhecidas como promotoras de crescimento de plantas (BPCPs) são residentes epifíticas ou endofíticas, não patogênicas, que atuam na promoção de crescimento de forma direta, pela produção de fitormônios, solubilização de minerais e fixação biológica de nitrogênio, ou indireta, principalmente como agentes de controle biológico de doenças de plantas (MARIANO *et al.*, 2004). Dentre as principais bactérias consideradas benéficas destacam-se: *Pseudomonas* spp. fluorescentes, *Bacillus* spp., *Azospirillum* spp. e *Azotobacter* spp (COELHO, 2006).

Dentre os antagonistas mais estudados, o *Bacillus* destaca-se no controle de doenças do filoplano e em pós-colheita (PUSEY *et al.*, 1986; FERREIRA *et al.*, 1991; BETTIOL *et al.*, 1994; MONTEIRO *et al.*, 2012). O gênero *Bacillus* spp é um dos mais importantes encontrado no solo, principalmente os entomopatogênicos, que possuem a capacidade de produzir endósporos e toxinas, importantes no controle de pragas agrícolas (HABIB e ANDRADE, 1998; DIAS *et al.*, 1999; FRITZ *et al.*, 2010).

Portanto, o presente trabalho tem como objetivo isolar e caracterizar morfológica e geneticamente bactérias do tipo *Bacillus* spp, nativas de solo de diferentes manejos de cultivo e sistema natural da região oeste do estado do Paraná, visando o reconhecimento de novas estirpes com potencial para agente de biocontrole.

## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 RIZOBACTÉRIAS PROMOTORAS DE CRESCIMENTO DE PLANTAS

O solo é o habitat de uma grande variedade de micro-organismos, vegetais (microflora) e animais das mais variadas dimensões (microfauna e macrofauna). A ação microbiana do solo depende de diversos fatores, como temperatura, arejamento e condições de umidade, reação e teor em elementos nutritivos, além da competição e antagonismos que se estabelecem entre os próprios grupos de micro-organismos (KATO *et al.*, 2006).

As principais atividades exercidas pela microbiota do solo é a decomposição da matéria orgânica, produção de xenobióticos e húmus, ciclagem de nutrientes e energia, fixação de nitrogênio atmosférico, produção de compostos complexos que causam agregação do solo, e controle biológico de pragas e doenças (RECHE e FIUZA, 2005).

As bactérias são o grupo mais importante de micro-organismos do solo, no qual, em condições favoráveis, atingem números extraordinariamente elevados. As rizobactérias são bactérias que habitam a rizosfera, região do solo que sofre influencia das raízes, podendo ser classificadas como nocivas, neutras ou benéficas. Dentro desse grupo estão as rizobactérias promotoras de crescimento de plantas (PGPR) (DOBBELAERE *et al.*, 2003). Essas bactérias podem ser epifíticas, que habitam a superfície dos tecidos vegetais, ou endofíticas, que residem no interior das plantas sem causar dano. Elas podem atuar diretamente na promoção de crescimento, produzindo compostos que auxiliem na nutrição das plantas e/ou que facilitem a entrada de certos nutrientes do ambiente para as plantas por promoverem a solubilização de fosfatos minerais, fixação biológica de nitrogênio e produção de hormônios de crescimento, como auxinas e giberelina; ou indiretamente como agentes de controle biológico de doenças, reduzindo ou prevenindo a ação de micro-organismos (MARIANO *et al.*, 2004; COELHO, 2006; KUSS, 2006).

Diversos gêneros de bactérias vêm sendo estudados quanto à capacidade de promover crescimento, entre eles destacam-se os *Bacillus spp.*, *Pseudomonas spp.* fluorescentes, *Azospirillum*, *Azotobacter spp* (COELHO, 2006) e *Rhizobium* (VENEGAS e SCUDELER, 2011), dos quais apresentam benefícios na germinação de sementes, emergência de plântulas e crescimento das plantas (LAZZARETTI e BETTIOL, 1997).

O mercado consumidor de rizobactérias promotoras de crescimento de plantas tem aumentado significativamente em diversas partes do mundo, auxiliando na aceleração do

desenvolvimento e rendimento de culturas agronomicamente importantes (CHEN *et al.*, 1994; AMARA e DAHDOH, 1997; ASGHAR *et al.*, 2002; SILVA *et al.*, 2006).

Experimentos em condições controladas e em condições de campo mostraram aumento da emergência de plântulas em até 100% ocasionadas por *P. fluorescens* e *P. putida* quando submetidas a condições de baixa temperatura do solo (KLOEPPER *et al.*, 1986). Da mesma forma esses autores verificaram que plantas originadas de sementes com *Pseudomonas*, tiveram um conteúdo de massa seca maior que o controle quando mantidas a um período de frio, sendo atribuída essa promoção da emergência de plântulas à produção de antibióticos por estas bactérias (HOFTE *et al.*, 1991). Dileep *et al.* (1998) inocularam espécies de *Pseudomonas fluorescentes* isoladas da rizosfera de arroz e pimentão em sementes de arroz, amendoim e quiabo. A germinação das sementes, principalmente no amendoim, o comprimento dos ramos e raízes, crescimento das plântulas e a produção das culturas aumentaram com a inoculação das espécies. Em plantas de alface hidropônico, Utkhede *et al.* (2000) verificaram que o produto formulado à base de *Bacillus subtilis*, aumentou a massa da matéria fresca da parte aérea e raízes, e reduziu o índice de doenças nas plantas.

Bactérias do gênero *Bacillus* estão incluídas entre as BPCPs (CHANWAY *et al.*, 2000). Essas bactérias apresentam diversas características favoráveis para à produção de inoculantes comerciais, como produção endósporos, manuseio e aplicação facilitada, inclusive em mistura com outros defensivos. Outro aspecto que as inclui entre as rizobactérias é a sua capacidade de controle biológico e produção de antibióticos (FREITAS e PIZZINATTO, 1997, SANTOS *et al.*, 2006).

Portanto, a busca e utilização de novas bactérias com aplicabilidade biotecnológica tem cada vez suporte nas pesquisas que visam desenvolver meios para exploração desses potenciais. Dentro deste contexto, a produção agrícola pode ter um aumento significativo com a inoculação de BPCPs (CADETE, 2009).

## 2.2 *Bacillus* spp. NO CONTROLE BIOLÓGICO DE FITOPATÓGENOS

O controle de pragas e doenças tem sido realizado através do emprego de defensivos químicos, que aplicados de forma errada, causam desequilíbrio ecológico. A utilização de forma exagerada desses produtos causa poluição do meio ambiente, atuando sobre inimigos naturais e promovendo o surgimento de populações resistentes. Essa eficácia inadequada do

controle químico impulsionou crescimento do controle biológico como alternativa para a gestão integrada da doença e pragas em várias culturas (PRAÇA *et al.*, 2004; MAFIA *et al.*, 2009)

O controle microbiano é uma forma de biocontrole que utiliza micro-organismos entomopatogênicos no controle de pragas, porém para a efetividade deste procedimento também se faz necessário o uso de um conjunto de medidas que trabalhem em harmonia com o meio ambiente, como o manejo integrado de pragas e doenças, diminuindo as populações e os efeitos das pragas e doenças na agricultura (ALVES *et al.*, 2008).

O crescimento de fitopatógenos como fungos, bactérias, insetos e nematóides, pode ser inibido através da ação antagonista de micro-organismos benéficos, principalmente bactérias que habitam a rizosfera das plantas. As rizobactérias pertencentes aos grupos das Proteobacteria (*Pseudomonas* e *Burkholderia*) e Firmicutes (*Bacillus* e gêneros afins) são os mais bem estudados em relação aos efeitos supressores causados a patógenos de vegetais (RAAIJMAKERS *et al.*, 2009).

Os fitopatógenos atacam as plantas de diversas formas, através produção de fitotoxinas, alteração na disponibilidade de água, íons e substâncias promotoras de crescimento de plantas (JAGADEESH *et al.*, 2006). Vários mecanismos podem ser utilizados pelas rizobactéria a fim de inibir o crescimento desses patógenos, dentre eles podemos citar a produção de substâncias antimicrobianas, por exemplo, sideróforos,  $\beta$ -1,3 glucanase, quitinases, antibióticos e ácidos cianídricos (ARAÚJO *et al.*, 2005; HAAS e DÉFAGO, 2005; PAL e GARDENER, 2006; COELHO, 2006); competição por espaço e nutrientes com fitopatógenos e outros micro-organismos prejudiciais à rizosfera (PEIXOTO, 1997; ROBIN *et al.* 2008); e indução de resistência nas plantas (LUZ, 1993; WALL e SANCHEZ, 1993; BUCHENAUER, 1998; VANLOON *et al.*, 1998; CATTELAN *et al.*, 1999; ENEBACK e CAREY, 2000; RAMAMOORTHY *et al.*, 2001; WHIPPS, 2001; VISWANATHAN e SAMIYAPPAN, 2002; BARROS *et al.*, 2010).

Apesar de serem poucas as bactérias com alta capacidade de controlar as populações de insetos, várias espécies são consideradas potenciais, entretanto somente as do gênero *Bacillus* spp., principalmente a *Bacillus thuringiensis* (Bt), são utilizadas em larga escala para o controle biológico de insetos (POLANCZYK *et al.*, 2008).

Diversos estudos realizados destacam a importância das rizobactérias no biocontrole de doenças e pragas em diversas culturas e no pós-colheita. Luz (1993) cita a eficiência de diversos antagonistas na redução do mal-do-pé do trigo (*Gaeumannomyces graminis* var. *tritici*), onde o *Bacillus subtilis* apresentou um maior controle da doença, 98% de proteção,



quando comparado aos outros antagonistas. Perondi *et al.* (1996) reduziu no campo a giberela do trigo (*Giberella zeae* – *Fusarium graminearum*) utilizando *B. subtilis*, *Bacillus sp.* e a levedura *Sporobolomyces roseus* na faixa de 67 a 87 %.

Silva-Werneck *et al.* (2000) com o objetivo de encontrar princípios ativos no controle da lagarta-do-cartucho, testou 205 isolados de *Bacillus spp.* obtidos de diferentes regiões brasileiras, onde somente um isolado apresentou 100% de mortalidade. Valicente e Barreto (2003) testaram um total de 3.408 cepas de *Bacillus thuringiensis* contra *Spodoptera frugiperda* coletados a partir de 1448 amostras de solo em 10 estados brasileiros pertencentes a quatro regiões geográficas distintas. Um total de 62 % matou entre 81% e 100% e 1758 não causaram mortalidade. A maior proporção de cepas eficientes, com mortalidade acima de 75%, foi encontrada a partir do total de isolados da Região Sul (16,6%), seguido pelas regiões Centro-Oeste (3,1%), Sudeste (1,1%) e região Nordeste (0,4%). Polanczyk, (2004) analisou 24 amostras de solos coletadas no estado de São Paulo, isolando 461 colônias bacterianas, das quais 190 foram identificadas como *Bacillus thuringiensis* (Bt). Cavaleiro *et al.* (2005) a partir do processamento de 94 amostras de solos e 2 de insetos mortos, isolaram novas estirpes de *Bacillus* obtendo 32 estirpes de Bt e 5 de *B. sphaericus*.

Moreira e Araujo (2013) caracterizaram o efeito antagonista contra *Aspergillus niger* de 127 isolados bacterianos do gênero *Bacillus spp.* obtidos de raízes jovens de *Eucalyptus urograndis*, onde 15% dos isolados apresentaram maior ação inibitória ao crescimento do fungo. Estudos realizados por Cunha (2006) e Araújo *et. al* (2011) sobre o efeito antagonista de rizobactérias, verificaram que além da capacidade de biocontrole, esses micro-organismos promoviam o crescimento de plantas, sendo um importante critério de avaliação na seleção de estirpes para promoção de crescimento vegetal.

Embora haja inúmeros relatos sobre os benefícios das BPCPs no aumento da produção de culturas agrícolas, a utilização desses micro-organismos como inoculantes comercial nem sempre tem fornecido bons resultados, devido as suas dificuldades de se estabelecer e sobreviver nas diferentes condições edafoclimáticas (ATKINSON e WATSON, 2000). A inconsistência dos resultados dos agentes de controle no campo está relacionada com a complexa interação das plantas hospedeiras, patógeno, antagonista e o meio ambiente.

Para aplicar com sucesso tais agentes, é necessário um grande entendimento de sua ecologia. Um maior conhecimento em relação à diversidade, distribuição e atividades de rizobactérias é de extrema importância para a identificação de novas linhagens, para a formulação de inoculantes estáveis de alta qualidade e prazo de vida adequado, e para determinação de quais as lavouras em que eles poderão ser aplicados (GARDENER, 2004).

## 2.3 DIVERSIDADE DE *Bacillus* spp. NO SOLO.

A microbiota do solo depende das distintas reações químicas que nele ocorrem, sendo alteradas sempre que houver algum tipo de interferência no ecossistema. Portanto, a execução de diferentes tipos de manejo afeta a disponibilidade de diferentes substratos, determinando dessa forma o favorecimento ou inibição dos diferentes grupos microbianos (CASTRO *et al.*, 1993). Porém, apesar do solo cultivado ser utilizado de forma contínua para diversas práticas agrícolas, ele também pode ser considerado rico microbiologicamente, pois ainda pode abrigar diversos micro-organismos considerados importantes no controle biológico de doenças e pragas da agricultura (AZEVEDO, 1998a).

Neste contexto, a coleta e isolamento de entomopatógenos são de extrema importância, pois fornece subsídios para os estudos de dinâmica populacional e ecologia dos micro-organismos no ambiente em que se encontram, permitindo a formação de bancos ou coleções voltadas para atividades didáticas e científicas, pois dentre a vasta quantidade de patógenos existentes, muitos tem potencial para ser empregados de forma aplicada em programas de controle biológico de pragas e vetores de doenças (ALVES *et al.*, 1998).

O gênero *Bacillus* spp. é um dos mais importantes encontrados no solo, principalmente os entomopatogênicos, que possuem a capacidade de produzir endósporos e toxinas, importantes no controle de pragas agrícolas (HABIB e ANDRADE, 1998; DIAS *et al.*, 1999; JUNIOR, 2011). Atualmente na “*List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature*” organizada pelo pesquisador J.P. Euzéby há citação de 295 espécies e de 7 subespécies no gênero *Bacillus* spp., conforme o site ([www.bacterio.cict.fr/b/bacillus.html](http://www.bacterio.cict.fr/b/bacillus.html)).

Os *Bacillus* caracterizam-se por apresentar forma de bastonetes, aeróbias ou anaeróbias facultativas, com parede celular estruturada em multicamadas e formação de endósporos resistentes a diversos fatores abióticos, como calor, frio, condições extremas de pH, pesticidas, fertilizantes e ao tempo de estocagem (KLOEPPER, 1997; MONTEIRO, 2002). Além disso, ele secreta diversos compostos importantes de baixo peso molecular, como antibióticos, moléculas sinalizadoras e enzimas extracelulares (GARDENER, 2004), possibilitando sua ocupação em diversos agroecossistemas.

Esse gênero possui várias espécies importantes, entre elas o *B. thuringiensis* é o de maior destaque, caracterizando-se como uma bactéria gram-positiva produtora de proteínas cry que possui atividade inseticida a diversos insetos, nematóides, protozoários e ácaros (GILL *et al.*, 1995; CAPALBO *et al.*, 2005). Outras espécies importantes são *B. sphaericus*

(SILVA *et al.*, 2002; LITAIF *et al.*, 2008) *Bacillus cereus* (HANDELSMAN *et al.*, 1990; HABIB e ANDRADE, 1998; RYDER *et al.*, 1999), *Bacillus circulans* (BERGE *et al.*, 1990), *Bacillus firmus*, *Bacillus licheniformis* (CHEN *et al.*, 1996; GARCIA *et al.*, 2004), *Bacillus subtilis* (TURNER e BLACKMAN, 1991; ZHANG e SMITH, 1996; FILHO *et al.*, 2011).

Diversos trabalhos estudam a diversidade de *Bacillus* spp. encontrados nos solos, Fritz *et al.* (2010) estudaram a frequência de espécies desse gênero no solo de diferentes cultivos de arroz irrigado, obtendo 336 bactérias, das quais 35,42% foram identificadas como *B. thuringiensis*, 16,96% como *B. cereus*, 9,52% como *B. sphaericus* e 38,10% como *Bacillus* sp. Do mesmo modo, Polanczyk *et al.* (2004) isolando micro-organismos de solos orizícolas, encontraram 772 colônias bacterianas, das quais 50,27% eram isolados de *Bacillus*. Dentre estas, 79,0% foram identificados como *B. thuringiensis* e 21,0% como *B. cereus*.

Silva (2008) com objetivo analisar a distribuição e diversidade de isolados de *Bacillus thuringiensis* (Bt) obtidos de diferentes ecossistemas do Estado do Espírito Santo, coletou 19 amostras de solos, obtendo 165 colônias bacterianas, sendo que sete foram identificados como Bt.

Nos últimos anos houve um aumento significativo no emprego de micro-organismos em práticas agrícolas, devido ao potencial que a promoção de crescimento vegetal e o controle biológico tem de substituir os produtos químicos, favorecendo dessa maneira a preservação do meio ambiente (SOUZA, 2001; PEIXOTO NETO *et al.*, 2002), aumentando o interesse no estudo da ocorrência, do potencial de colonização e da utilização dessas bactérias (MARIANO *et al.*, 2004).

## 2.4 FERRAMENTAS NO ESTUDO DA DIVERSIDADE DE MICRO-ORGANISMOS

O crescente interesse pela comunidade microbiana da rizosfera e seus efeitos sobre o solo e as plantas, aliado com surgimento das técnicas moleculares para caracterização de rizobactérias, contribuiu para o aumento do número de gêneros descritos como BPCP, abrangendo grupos bacterianos pertencentes às famílias *Enterobacteriaceae* e *Pseudomonadaceae*, além dos filos *Actinobacteria* e *Firmicutes* (RODRÍGUEZ-DÍAZ *et al.*, 2008).

A utilização de um único método de caracterização, seja ele fenotípico ou genotípico, não é o suficientemente preciso para a caracterização de um organismo, mas o emprego

conjunto das técnicas clássicas e moleculares desempenha um papel fundamental na identificação de espécies (RODRÍGUEZ-DÍAZ *et al.*, 2008).

As características fenotípicas de um determinado micro-organismo não são estáveis, sofrendo alterações dependendo do meio ambiente, podendo haver diferenças em cada meio de cultivo (HUNGRIA e SILVA, 2011). Porém, ainda assim, a caracterização morfológica de colônias bacterianas para a avaliação de diversidade serve como um complemento importante para as análises genéticas, uma vez que possibilita a construção de agrupamentos de indivíduos morfológicamente semelhantes. Portanto, a seleção de representantes dos grupos permitirá nas etapas posteriores de caracterização, trabalhar com um número menor de isolados, diminuindo a perda da informação acerca da diversidade do sistema agroecológico (FONSECA *et al.* 2000). Na análise morfológica se estuda as mais diversas características do micro-organismo, dentre elas a morfologia das colônias, formação de cápsulas, estudo da motilidade, coloração de flagelos (YANNI *et al.*, 1997; VALVERDE *et al.*, 2003; PRAYITNO e ROLFE, 2010) dentre outras, o que podem auxiliar na otimização dos meios de cultivo permitindo uma melhor probabilidade de obtenção mais segura e quantitativa de diferentes isolados puros.

A caracterização genotípica ou molecular, ao contrário da caracterização fenotípica, é estática, não sofrendo alterações devido ao ambiente (HUNGRIA e SILVA, 2011). A maioria dos métodos moleculares que vêm sendo empregados na caracterização de isolados, linhagens e estirpes, tem como base técnicas inspiradas no PCR (*Polymerase Chain Reaction*). Inúmeros trabalhos relatam sobre o uso das mais diversas técnicas na caracterização genotípica, sendo que a maioria utiliza o polimorfismo dos espaçadores (IGS – *Intergene Sequences*) do DNA ribossômico, DGGE (*Denaturing Gradient Gel Electrophoresis*), TGGE (*Temperature Gradient Gel Electrophoresis*), PCR-SSCP (*Single-Strand-Conformation Polymorphism*), PCR de seqüências repetitivas de DNA (rep-PCR usando primers REP, ERIC ou BOX), PCR com primers randômicos (RAPD, AP-PCR) e AFLP (*Amplified Fragment Length Polymorphism*) (STRALIOTTO e RUMJANEK, 1999).

O método rep-PCR (*repetitive-sequence-based-PCR*) consiste na amplificação de DNA através da utilização de *primers* complementares a regiões repetitivas e conservadas de DNA, (de BRUIJN, 1992; VERSALOVIC *et al.*, 1994), que estão presentes em múltiplas cópias do genoma da maioria das bactérias (MAHUKA *et al.*, 2006). Existem três grupos principais de elementos repetitivos, incluindo as seqüências REP (*Repetitive Extragenic Palindromic*), formado por 35-40 pb (STERN *et al.*, 1984), ERIC (*Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus*), que possui 124-127 pb (HULTON *et al.*, 1991) e BOX, formado por 3

subunidade: box A, formado por 54 pb; box B, que possui 43 pb; e box C, com 50 pb (MARTIN *et al.*, 1992); mas somente a subunidade box A é altamente conservada em bactérias (KOEUTH *et al.*, 1995).

Outra técnica utilizada é ARDRA (Análise de restrição de DNA ribossomal amplificado) que consiste na amplificação de uma região do rDNA com posterior digestão com uso de enzimas de restrição, revelando o polimorfismo presentes nos fragmentos de DNA analisados e no grau de conservação dos sítios de restrição do rDNA. Esta técnica é bastante útil para uma rápida análise da diversidade genética (GRIFONI *et al.*, 1995). Os ácidos ribonucleicos ribossomais (rRNA) são considerados os biopolímeros mais adequados para estudos de diversidade (LANE *et al.*, 1985). No DNA das bactérias, os operons de rDNA são compostos pelos genes 16S, 23S e 5S (KLAPPENBACH *et al.*, 2000) que são separados por regiões ITS (*Internal Transcribed Spacer*). Essa região intergênica apresenta maior variabilidade não só na sua composição de bases como também no seu tamanho quando comparadas às regiões gênicas 16S ou 23S, sendo recomendada para estudos de indivíduos com elevada afinidade genética (ROSADO *et al.*, 1999).

Assumpção *et al.*, (2009) avaliando a diversidade bacteriana endofítica de sementes de soja, identificaram 12 perfis de restrição por meio da ARDRA, dentre eles *Bacillus*, *Paenibacillus*, *Pseudomonas*. Em um estudo semelhante de diversidade de bactérias do sedimento de manguezal da ilha do Cardoso Cananéia, por meio da técnica de ARDRA foram obtidos 10 perfis de restrição, que após identificação por meio do perfil de ácidos graxos (MIDI-FAME), mostrou que os gêneros *Vibrio*, *Listonella*, *Aeromonas*, *Microbacterium*, *Dermabacter*, *Brevibacterium*, *Paenibacillus*, *Staphylococcus*, *Kurthia*, *Bacillus*, *Nesteronkonionia*, *Kytococcus*, *Kocuria* e *Rothia* foram os predominantes (DIAS, 2008).

### 3 OBJETIVO GERAL

Este trabalho tem como objetivo geral isolar e caracterizar morfológica e geneticamente bactérias do tipo *Bacillus* spp, nativas de solo de diferentes manejos de cultivo e sistema natural, visando o reconhecimento de novas estirpes com potencial para agente de biocontrole e/ou outros potenciais biotecnológicos.

#### 3.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Caracterizar morfolologicamente as estirpes obtidas nos diferentes manejos de cultivo;
- Agrupar geneticamente as estirpes por reação de ARDRA-PCR;
- Comparar a diversidade genética e morfológica dos grupos obtidos em relação aos diferentes manejos de cultivo e natural;

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 LOCAL DA PESQUISA

O estágio foi realizado no laboratório de Microbiologia do Solo, no Instituto Agrônomo do Paraná- IAPAR, localizada em Londrina – PR, sob a supervisão da Dra. Diva de Souza Andrade.

### 4.2 COLETA DOS SOLOS

As coletas dos solos foram realizadas nas localidades de Palotina, Parque Estadual São Camilo-Palotina, Toledo, Marechal Cândido Rondon, Margarida-MCR e Francisco Alves, todas localizadas na região oeste do estado do Paraná (FIGURA 1). Dentre os diferentes manejos, cinco correspondem a áreas agricultáveis e um representando a área de mata nativa (TABELA 1).



FIGURA 1: Locais de coleta dos solos. Fonte: Google Maps.

Para a coleta dos solos, selecionaram-se seis diferentes áreas, representado pela letra “M”. Os solos foram coletados em quatro repetições diferentes, com auxílio de um trado holandês, em uma profundidade aproximada entre 10 e 20 cm, local do solo que concentra a maior parte do sistema radicular ativo e maior atividade microbiana (ANDRADE e HAMAKAWA, 1994).

Cada área de coleta foi dividida em cinco transeptos paralelos, denominados como transepto A, B, C, D e E, traçados diagonalmente de acordo com o declive e direção do curso de água, homogeneidade do terreno, fertilidade do solo, derivação de agroquímicos, entre outros. Levou-se em consideração o efeito bordadura, desconsiderando-se, portanto, uma borda de aproximadamente 50 metros na transição entre lavoura-mata ciliar e mata ciliar-rio. O transepto mais distante do leito de água, neste caso o transepto E, foi desconsiderado a fim de manter maior homogeneidade dentro da área (FIGURA 2) (NEIVERTH, 2012).

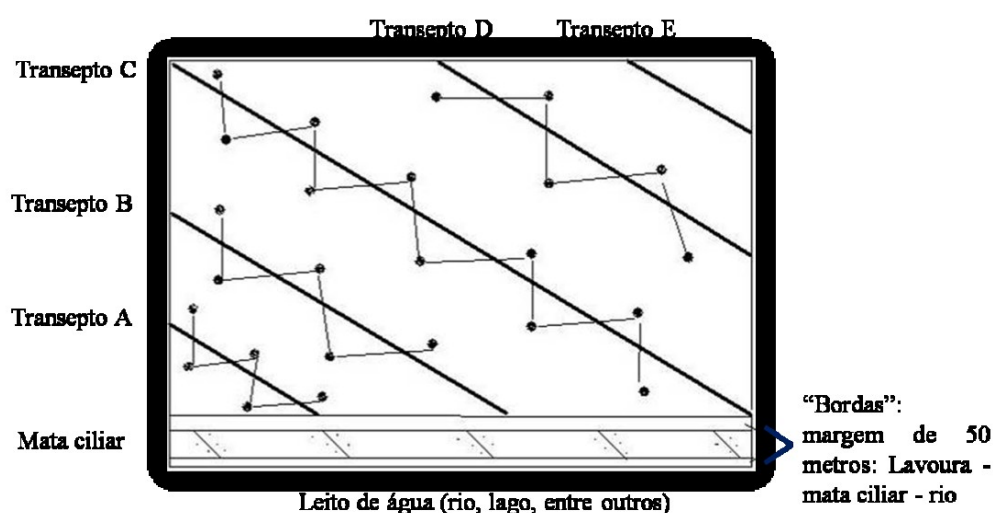


FIGURA 2. Distribuição estatística dos pontos de coleta de solo referentes às sub-amostras por repetição em relação à gleba (tipo de manejo), utilizados para obtenção dos isolados.

Os transeptos passaram a ser denominados de repetições (repetição 1, 2, 3, 4), sendo cada uma constituída por cinco sub-amostras. Estas foram coletadas a partir de uma linha imaginária em “zigue-zague” traçada sobre o transepto, promovendo uma maior homogeneidade dentro da repetição. Após a coleta das cinco sub-amostras por repetição, estas foram homogeneizadas, separando uma amostra deste solo, devidamente etiquetado e mantido em gelo durante a coleta (BUCKLAND *et al.*, 2001). Os pontos de coleta das sub-amostras por repetição dentro de cada tipo de manejo foram obtidos por *Global Positioning System* (GPS) (TABELA 2).



TABELA 1: Pontos de coleta das sub-amostras por repetição de acordo com cada tipo de manejo, obtidas por Global Positioning System (GPS).

	Manejo	Local	Repetições			
			R1	R2	R3	R4
<b>M1</b>	Plantio Direto	Palotina	S 24° 15' 6052'' W 53° 46' 4,974''	S 24° 15' 24,156'' W 53° 56' 4,9236''	S 24° 15' 23,5512'' W 53° 55' 58,3464''	S 24° 15' 23,7312'' W 53° 55' 57,4716''
<b>M2</b>	Horticultura	Toledo	S 24° 48' 11,466'' W 53° 46' 34,14''	S 24° 48' 11,466'' W 53° 46' 34,14''	S 24° 48' 11,466'' W 53° 46' 34,14''	S 24° 48' 11,466'' W 53° 46' 34,14''
<b>M3</b>	Pastagem	Marechal	S 24° 31' 23,4804'' W 54° 4' 2,3268''	S 24° 31' 23,28'' W 54° 4' 3,486''	S 24° 32' 3,9912'' W 54° 3' 5,6772	S 24° 32' 3,9912'' W 54° 3' 5,6772
<b>M4</b>	Sistema Agropastoril (Soja- Gado)	Franscisco Alves	S 24° 4' 22,96'' W 53° 50' 40,6868''	S 24° 3' 56,1492'' W 53° 51' 55,9008''	S 24° 4' 22,2916'' W 53° 50' 37,554''	S 24° 5' 49,0488'' W 53° 5' 40,2948''
<b>M5</b>	Mata nativa	Parque São Camilo – Palotina	S 24° 18' 28,944'' W 53° 54' 16,6608''	S 24° 18' 30,1788'' W 53° 54' 18,4032''	S 24° 18' 33,0552'' W 53° 54' 24,1884''	S 24° 18' 29,0304'' W 53° 54' 23,814''
<b>M6</b>	Plantio Convencional	Margarida – MCR	S 24° 56' 7,8216'' W 54° 17' 50,91''	S 24° 56' 7,8216'' W 54° 17' 50,91''	S 24° 56' 7,8216'' W 54° 17' 50,91''	S 24° 36' 25,1316'' W 54° 10' 3,0612''

#### 4.3 SELEÇÃO DE ISOLADOS DE *Bacillus* spp.

Para o isolamento, foram pesadas 10 gramas de solo de cada repetição dos diferentes manejos de cultivo e diluídas em 90 mL de solução salina 0,85% em frascos contendo pérolas de vidro, previamente autoclavados, obtendo dessa forma uma diluição  $10^{-1}$ . Os frascos foram mantidos em um agitador mecânico horizontal por 30 minutos. Em câmara fluxo laminar, 1 mL da solução é transferida para novos tubos contendo 9 mL de solução salina 0,85% de forma seriada, até obter as diluições de trabalho,  $10^{-3}$  e  $10^{-4}$  (VINCENT, 1970).

Os frascos contendo as diluições de trabalho foram submetidos a um choque térmico de 70°C por 10 min, para selecionar os micro-organismos pertencentes ao gênero *Bacillus* spp. que são resistentes a esse tratamento (BUCHANAN e GIBBONS, 1975). Posteriormente, foi efetuado o plaqueamento em triplicata de 100 µL de cada diluição em meio Digs (BALDANI, 2007) com pH ajustado para 6,5 e incubado por 48 horas em estufa a 28°C-30°C. Este meio é composto 2,0 g de glicose; 2,0 g de ácido málico; 1,5 g de peptona bacteriológica; 2,0 g de extrato de levedura; 0,5 g de  $K_2HPO_4$ ; 0,5g  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ ; 1,5 g de ácido glutâmico e seu volume ajustado para um litro. Adicionou-se 13g de ágar bacteriológico e depois foi autoclavado a 120°C por 20 minutos.

#### 4.4 QUANTIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICAS DOS ISOLADOS DE *Bacillus* spp.

O crescimento bacteriano foi avaliado pelo método de Unidades Formadoras de Colônias (u. f. c.), em que a quantificação é dada pela contagem do número de células viáveis presentes em uma suspensão. O método em placas tem como princípio que cada colônia surgida é originária de uma única célula viável e leva em consideração a diluição e inoculação realizadas corretamente (HUNGRIA e ARAÚJO, 1994).

As colônias bacterianas foram caracterizadas morfolologicamente de acordo com o protocolo estabelecido por Fonseca *et al.* (2000), sendo considerados os seguintes aspectos: tamanho (>2 mm, 1-2mm, puntiforme), forma (circular ou irregular), borda (lisa ou ondulada), homogeneidade (homogênea ou heterogênea), cor (amarelo, amarelo claro, amarelo esverdeado, amarelo forte, creme e branco), transparência (transparente ou opaca), elevação (presença ou ausência), muco (pouco, médio e muito) e tempo de crescimento dos isolados.

Os isolados bacterianos foram, após a caracterização morfológica, armazenados em meio de cultivo Digs líquido contendo 30% glicerol, mantidas a -20°C. Este método de manutenção é simples e barato, oferecendo boa segurança para o armazenamento de diversos micro-organismos a médio e longo prazo, pois diminui o metabolismo celular (COSTA e FERREIRA, 1991; TORTORA *et al.*, 2012). O glicerol age como um agente crioprotetor, a fim de manter a estirpe com vida e preservar suas características originais (BALATTI, 1992). Ele impede a difusão da água no interior das células e reduz a formação de cristais de gelo, além de estabilizar alguns componentes da membrana celular, impedindo alterações celulares (CAMPOS *et al.*, 2004).

As análises das características morfológicas foram feitas utilizando o programa BioNumerics (*Applied Maths*, Versão 7.1). Para a análise de agrupamento e obtenção dos *clusters* foi utilizado o coeficiente de similaridade de Pearson e para a construção do dendograma foi escolhido o algoritmo UPGMA (*Unweighted Pair Group Method using Arithmetic averages*)

## 4.5 CARACTERIZAÇÃO GENÉTICA

### 4.5.1 Extração de DNA

Para a extração de DNA utilizou-se o protocolo modificado de Sambrook *et al.* (2001). Para o procedimento, pipetou-se da solução bacteriana crescida em meio Digs líquido 1,5 mL de amostra para um tubo de 2,0 mL tipo *Eppendorf*, o qual foi centrifugada a 12.000 rpm por 2 minuto e descartado o sobrenadante. Adicionou-se 1 mL de solução salina (NaCl 0,85%) aos tubos para lavar o *pellet* e posteriormente centrifugados a 13.200 rpm por 2 minutos, descartando o sobrenadante. Ressuspendeu-se o precipitado em 100 µL de TE 50:20 (50mM de Tris e 20mM de EDTA-Na<sub>2</sub>, pH 8). Em seguida, adicionou-se 10 µL de SDS 1% (1 g de *Sodium Dodecyl Sulphate* em 100 mL de H<sub>2</sub>O ultrapura), 5 µL de Lisozima (5 mg/mL em H<sub>2</sub>O), agitando a solução rapidamente em vórtex, sendo posteriormente incubada a 40°C em banho seco (*Dry Bath Incubator*) por 10 minutos.

Após o período de incubação, a solução foi deixada a -20°C por 10 minutos. Ao final do tempo, adicionou-se 62,7 µL de Acetato de Sódio 7,5 M (57,81 g em 100 mL de H<sub>2</sub>O ultrapura), centrifugando por 13.000 rpm por 5 minutos.

Após a centrifugação, adicionou-se aos tubos 500 µL de fenol-cloroformio-álcool isoamílico (25:24:1), agitando os tubos por inversão e centrifugando a 13.200 rpm por 10 min. Transferiu-se 500 µL do sobrenadante de cada amostra para um novo tubo eppendorf de 1,5 mL e adicionou-se 500 µL clorofórmio-álcool isoamílico, agitando os tubos por inversão e centrifugando a 13.200 rpm por 10 min.

Transferiu-se 500 µL do sobrenadante de cada amostra para um novo tubo eppendorf de 1,5 mL e adicionou-se 360 µL de álcool isopropanol gelado, invertendo lentamente o tubo para precipitar o DNA. Os tubos foram armazenados por 15 minutos em ultrafreezer a -80°C.

Em seguida, as amostras foram deixadas por 10 minutos em repouso em temperatura ambiente e centrifugadas a 12.000 rpm durante 15 min, descartando, posteriormente, o álcool isopropanol e adicionou-se 400 µL de etanol 70% gelado para lavar o “pellet”, retirando o excesso de sais. O mesmo foi centrifugado a 13.200 rpm por 5 min, descartando depois o sobrenadante, tomando cuidado para não descartar o DNA. Os tubos contendo o DNA foram deixados secando em temperatura ambiente em fluxo laminar por cerca de 30 minutos à 1 hora, e ressuspensos em 50 µL de TE 10:1 (10 mM de Tris-HCl e 1mM de EDTA). As amostras foram incubadas por 1 hora em temperatura ambiente para solubilizar o DNA e depois armazenadas em freezer -20°C.

A verificação da pureza do DNA extraído foi feita aplicando 3 µL de corante de azul de bromofenol e 4 µL do DNA em gel de agarose 1% a 80 V por 1 hora. Posteriormente o gel foi corado com Brometo de Etídio por 15 min e visualizado sob luz UV em fotodocumentador.

A quantificação do DNA foi realizada equipamento ScanDrop (Analytik Jena), através de um chip. Cada chip possui 16 canaletas, na primeira adiciona-se 2 µL do branco (TE 10:1) e nas canaletas subsequentes adiciona-se 1 µL das suas amostras de DNA. O chip é inserido no equipamento onde primeiramente é verificada a qualidade do DNA através do quociente das absorbâncias obtidas a 260 nm e 280 nm, quanto mais próximo de 2 for valor apresentado, melhor é a qualidade do DNA. Depois é feita a quantificação do seu DNA através das absorbâncias obtidas a 260 nm, o resultado é apresentado em ng/0,5 µL.

#### 4.5.2 Amplificação do DNA por PCR utilizando primers para regiões intergênica 16S-23S do rRNA

Para detecção da diversidade genética das estirpes, o DNA das bactérias foi amplificado pela técnica de PCR com os *primers* FA-16S (5'

GGCTGGATCACCTCCTTTCT '3) e RC-23S (5' CCGGGTTTCCCCATTCGG '3) da Invitrogen Life Technologies, para regiões intergênicas (ITS) 16S-23S do rRNA (NAVARRO, 1992)

A reação foi realizada da seguinte forma: 35,2 µL de H<sub>2</sub>O ultra pura; 3,0 µL de dNTPs; 1,5 µL de MgCl<sub>2</sub> 50 mM; 5,0 de tampão PCR 10 X; 1,5 µL de primer FA-16S (10 pmol/µL); 1,5 µL de primer RC-23S (10 pmol/µL); 2 µL de DNA 50 ng/µL; 1,5 U/µL de *innuTaq* DNA polimerase (*Analytikjena*), com um volume final de 50 µL. As reações de PCR foram colocadas em termociclador para a reação de amplificação: 1 ciclo inicial de desnaturação a 95°C por 5 min; seguido de 40 ciclos de 1 min a 94°C promovendo a desnaturação, 1 min a 55°C, para o pareamento do primer e 2 min a 72°C para a extensão; 1 ciclo de extensão final a 72°C por 3 min; manutenção a 4°C.

Os fragmentos amplificados foram separados por eletroforese a 110 V por 1 hora, em um gel de agarose a 1,5%, diluído em tampão TBE 1X pH 8,0. Nas canaletas no gel foram aplicados 5 µL da reação de PCR e 5 µL de corante azul de bromofenol. Na primeira e na última canaleta do gel foram aplicados 5 µL do padrão de peso molecular de 1Kb (Plus DNA Ladder™ - Invitrogen Life Technologies). Os géis foram corados com brometo de etídeo e fotografados sob radiação ultravioleta (UV).

#### 4.5.3 Restrição por ARDRA-PCR

O produto da PCR obtido foi clivado com endonucleases do tipo II. As enzimas utilizadas na restrição foram a *Eco* RI 10 U/µL (Invitrogen Life Technologies) que reconhece a sequência 5'-G↓AATTC-'3 (MODRICH e ZABEL, 1976), *Nde* I 5U/µL (Invitrogen Life Technologies) que tem como sitio de reconhecimento quatro bases 5'-CA↓TATG-'3 (WATSON, 1982), e *Pst* I 10U/µL (Invitrogen Life Technologies) com sitio de reconhecimento 5'-C↓TGCAG-3' (BROWN e SMITH, 1976).

A reação foi realizada da seguinte forma: 1 µL H<sub>2</sub>O ultra pura; 5U/µL de enzima; 2 µL de tampão, 1 µL BSA (*Bovine Serum Albumin*) a 0,4 mg/mL; 10 µL da reação de PCR. As reações foram incubadas a 37°C por 6 horas.

Os fragmentos foram separados por eletroforese a 100V por 1 hora, em um gel de agarose 2,0 % diluído em tampão TBE 1X pH 8,0. Nas canaletas no gel foram aplicados 15 µL da reação de PCR e 5 µL de corante azul de bromofenol. Na primeira e na última canaleta do gel foram aplicados 5 µL do padrão de peso molecular de 1Kb (Plus DNA Ladder™ -

Invitrogen Life Technologies). Os géis foram corados com brometo de etídeo e fotografados sob radiação ultravioleta (UV), as bandas resultantes foram posteriormente analisadas pelo programa BioNumerics.

#### 4.5.4 Análise de agrupamento dos produtos obtidos por ARDRA-PCR

Os produtos da restrição foram analisados pelo programa BioNumerics (*Applied Maths*, Versão 7.1), utilizando o algoritmo UPGMA (*Unweighted Pair-Group Method with Arithmetic mean*) que se baseia na média das distâncias entre os perfis eletroforéticos, e o coeficiente de similaridade Jaccard, que compara o número de bandas semelhantes entre si com o número total de bandas.

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÕES

### 5.1 TIPAGEM MORFOLÓGICA DOS ISOLADOS

Dos solos coletados a partir dos diferentes manejos de cultivo, foram obtidos 208 isolados bacterianos, destacando-se com maior número de unidades formadoras de colônias o manejo M2 (horticultura) com 69 isolados e o M4 (agropastoril) com 61 representantes. O terceiro maior número refere-se ao solo do M3 (pastagem) com 29, seguido do M5 (mata nativa) com 24 isolados. Já os solos dos manejos M1 (plantio direto) e M6 (plantio convencional) foram os que ficaram com menor número de isolados, com 14 e 11 respectivamente (TABELA 3).

TABELA 2: Unidades Formadoras de Colônias (u.f.c) por manejo de cultivo

	Manejo	Cidade	Total de Colônias por Repetição				
			R1	R2	R3	R4	T1
<b>M1</b>	Plantio Direto	Palotina	1	3	5	2	11
<b>M2</b>	Horticultura	Toledo	24	15	25	5	69
<b>M3</b>	Pastagem	Marechal	7	2	17	3	29
<b>M4</b>	Sistema Agropastoril (soja-gado)	Francisco Alves	24	11	16	10	61
<b>M5</b>	Mata nativa	Parque São Camilo	4	3	11	6	24
<b>M6</b>	Plantio Convencional	Margarida – MCR	6	0	4	4	14

\*R- repetições das coletas em cada manejo. T- total de número de isolados nas repetições de cada tipo de manejo.

Em um agroecossistema a abundância microbiana sofre variações ao longo das estações do ano, havendo a cada estação a predominância de uma comunidade microbiana acompanhada de outras pouco abundantes (TORSVIK e ØVREAS, 2002). Tais variações estão relacionadas ao índice pluviométrico e ao clima da região, ao teor e à qualidade dos resíduos vegetais, à estrutura e aos manejos agrícolas adotados em cada agroecossistema (ROGERS e TATE III, 2001; TIEDJE *et al.*, 2001), e a planta hospedeira presente (diferentes

espécies, genótipos, estádios de desenvolvimento e exsudatos radiculares) (PICARD e BOSCO, 2008).

Os *Bacillus* são considerados micro-organismos ubíquos, não se correlacionando com qualquer característica do solo ou rotação de cultura, sendo capazes de se desenvolverem bem em vários ambientes (QUADROS, 2013).

O maior número de isolados encontrados nas áreas de horticultura (M2) e agropastoril (M4) se deve, principalmente, ao fato de que nestes manejos, a presença do vegetal de cobertura no momento da coleta das amostras de solo, pode ter proporcionado a liberação, pelas raízes, de diferentes exsudatos possibilitando a seleção de número maior de micro-organismos presentes na região rizosférica do solo, de onde as amostras foram retiradas (COELHO, 2006).

Outra questão relevante e que converge com o fator apontado anteriormente, é que nestas áreas (M2 e M4), o período de entressafra, ou seja, o tempo em que o solo fica descoberto é muito curto, portanto a presença da planta permite a deposição de rejeitos vegetais constantemente no solo proporcionando uma maior manutenção da composição da serrapilheira, o que estimula a presença de uma série de micro-organismos envolvidos na formação da matéria orgânica e também nas relações associativas com vegetais (TIEDJE *et al.*, 2001).

A colonização da rizosfera depende muito da habilidade da bactéria em utilizar os diferentes exsudatos radiculares. Os compostos secretados pelas raízes das plantas servem como importantes atrativos químicos e repelentes na rizosfera (ESTABROOK e YODER, 1998; BAIS *et al.*, 2001). Através da exsudação de uma vasta variedade de compostos, as raízes podem regular a comunidade microbiana do solo na sua vizinhança imediata, lidar com herbívoros, incentivar simbioses benéficas, mudar as propriedades físicas e químicas do solo, e inibir o crescimento de espécies de plantas concorrentes (NARDI *et al.*, 2000).

Coelho (2006) avaliando interação de *Pseudomonas* spp. e de *Bacillus* spp. com diferentes rizosferas observou uma maior quantidade de *Pseudomonas* spp. fluorescentes na rizosfera de alface crespa em relação às outras plantas analisadas; isso não ocorreu com *Bacillus* spp., cujos números foram semelhantes entre as várias rizosferas. Val-Moraes *et al* (2009) comparando a diversidade em áreas de horticultura e vegetação natural, constatou uma maior frequência de bactérias do filo Firmicutes, Bacteroidetes e Proteobactérias no solo com cultivo de hortaliças. A área analisada no estudo possui uma alta concentração de fósforo, favorecendo a presença do filo Firmicutes, principalmente o gênero *Bacillus*, que são



descritas como bactérias com grande potencial de solubilização de fósforo nos solos (RODRIGUES e FRAGA, 1999).

Os manejos agropastoris (M4) representam uma alternativa para intensificação do uso da terra, pois garantem a sustentabilidade dos sistemas de produção (RUSSELLE *et al.*, 2007). A inserção de animais pode alterar algumas propriedades do sistema, como reciclagem de nutrientes e agregação do solo, e melhorar a sua qualidade (INGRAM *et al.*, 2008; CARVALHO *et al.*, 2010).

Kaschuk *et al.* (2010) observou que pastagens bem manejadas, em rotação com culturas anuais resultam em benefícios significativos ao carbono da biomassa microbiana (CBM), enquanto pastagens contínuas e degradadas resultam em decréscimos do CBM.

Araujo e Pedroso (2013) avaliando a colonização de *Bacillus* na rizosfera de *Brachiaria decumbens*, *B. brizantha* e *Panicum maximum*, verificaram baixo número de colônias isoladas. Estudos recentes relatam que estas gramíneas produzem substâncias no sistema radicular que inibem o desenvolvimento de diversos grupos de bactérias (SUBBARAO *et al.*, 2009).

Áreas naturais (M5) possuem comunidades microbianas estáveis que levaram milhões de anos para se formarem, desempenhando um papel fundamental nos ciclos biogeoquímicos. Perturbações antrópicas no solo abalam o equilíbrio do ecossistema, forçando os micro-organismos a se adaptarem ao novo habitat. Diversos processos fisiológicos estão envolvidos nesta adaptação, estimulando e/ou suprimindo a ocorrência de comunidades microbianas específicas (QUADROS, 2013).

Em solos de mata, as perdas de nutrientes do ecossistema são menores em relação a aquelas sob campo, em consequência da maior diversidade da flora e melhor cobertura do solo, a vegetação do ecossistema induz maiores modificações no solo, principalmente o aumento do teor de matéria orgânica, gerando consequentemente aumento do número de micro-organismos. (FONSECA, 1984).

Entretanto, solos com mata nativa, sem trato cultural, apresentam comunidades bacterianas mais adaptadas ao meio ambiente, ou seja, um sinergismo maior e diversidade menor quando comparada com área sob cultivo de hortaliças, contudo, com esse plantio o ecossistema sofreu uma alteração, aumentando a sua dinâmica populacional e consequentemente o aumento da diversidade bacteriana (VAL-MORAES *et al.*, 2009)

O plantio direto (M1) é uma técnica agrícola de cultivo sem preparo prévio do solo, onde a semeadura é feita sobre os resíduos da cultura anterior. No cultivo convencional (M6), os resíduos pós-colheita são incorporados no solo com aração e gradagem após cada colheita.

Historicamente é sabido que nas condições de plantio direto a preservação da biota do solo se dá de maneira significativa em relação ao plantio convencional uma vez que, neste tipo de manejo, a incorporação de rejeitos vegetais permite a sustentação da serrapilheira, o que contribui para a manutenção das comunidades microbianas (CARVALHO, 1997; PEREIRA *et al.*, 2007)

No entanto, o baixo número de isolados obtidos nesses dois tipos de manejo, pode ter sido pelo fato do momento da coleta ter sido realizado em período de entressafra, não havendo nenhuma cultura instalada durante a amostragem, portanto, a amostragem microbiológica obtida dos dois manejos (M1 e M6), provavelmente se limitou a selecionar micro-organismos com capacidade de sobrevivência sem a presença dos exsudatos e outros compostos específicos da rizosfera, uma vez que, a composição das raízes interfere na ecologia microbiana do solo (QUADROS, 2013).

Quadros (2013) avaliando a diversidade microbiana de solo cultivado com diferentes composições de gramíneas e leguminosas sob plantio direto, obteve o gênero *Bacillus* como o segundo mais abundante nos tratamentos em geral, não havendo diferença significativa entre os tratamentos. Neste estudo, foram detectadas 110 espécies diferentes de *Bacillus*, sendo que a espécie mais abundante não foi classificada, seguido de *B. niacini*, *B. cereus*, *B. fumarioli*, *B. drentensis*, *B. senegalensis*, *B. soli*, *B. arbutinivorans*, e *B. thuringiensis*.

Os 208 isolados obtidos foram agrupados por tipagem morfológicas no programa BioNumerics, coeficiente de similaridade de Pearson, com similaridade de 70%, formando um total de 24 grupos (G) (TABELA 4; ANEXO A). De acordo com o número de perfis e agrupamentos morfológicos obtidos, verificou-se que o manejo M4 com 61 isolados, foi o que obteve um maior número de isolados distribuídos entre os grupos, estando presente em 18 grupos, o que supõe a presença de maior diversidade morfológica de isolados neste manejo, seguido do M2 com 69 isolados distribuídos entre 17 grupos. Ainda em consideração a distribuição dos perfis nos diferentes grupos, destacou-se em seguida as áreas M3 e M5, ambos distribuídos em 9 grupos, M1 e M6, com 8 grupos.

TABELA 3: Distribuição dos isolados provenientes de áreas sob diferentes manejos, segundo a classificação em grupos (G) da tipagem obtida pela análise das características morfológicas segundo Fonseca *et al.* (2000).

Grupos*	Manejos de cultivo						TOTAL
	M1	M2	M3	M4	M5	M6	
<b>G1</b>	0	2	0	3	0	0	5
<b>G2</b>	1	1	0	14	4	0	20

TABELA 3: CONTINUAÇÃO

<b>G3</b>	0	2	0	1	0	0	3
<b>G4</b>	0	0	2	10	3	1	16
<b>G5</b>	0	2	0	2	0	0	4
<b>G6</b>	1	4	0	1	0	0	6
<b>G7</b>	0	2	0	2	1	0	5
<b>G8</b>	0	1	1	0	0	0	2
<b>G9</b>	0	2	2	2	0	2	8
<b>G10</b>	2	2	0	1	1	0	6
<b>G11</b>	1	11	1	0	0	1	14
<b>G12</b>	0	12	4	6	0	2	24
<b>G13</b>	0	6	0	4	0	0	10
<b>G14</b>	0	1	2	3	0	1	7
<b>G15</b>	1	8	1	2	5	0	17
<b>G16</b>	1	11	15	4	1	0	32
<b>G17</b>	0	1	0	0	0	1	2
<b>G18</b>	0	0	0	1	0	0	1
<b>G19</b>	0	0	0	0	4	3	7
<b>G20</b>	1	0	0	0	3	0	4
<b>G21</b>	3	0	1	3	2	3	12
<b>G22</b>	0	0	0	1	0	0	1
<b>G23</b>	0	0	0	1	0	0	1
<b>G24</b>	0	1	0	0	0	0	1
<b>TOTAL</b>	11	69	29	61	24	14	208

\* Grupos obtidos a partir dos agrupamentos morfológicos, representados no ANEXO A. M1 – Plantio Direto; M2 – Horticultura; M3 – Pastagem; M4 – Sistema Agropastoril; M5 – Mata Nativa; M6 – Plantio Convencional.

O grupo 16 foi o que apresentou maior número de representantes (32), com isolados advindos de todos os manejos, exceto o M6 (plantio convencional). Neste grupo destaca-se ainda o manejo M3 (pastagem), por contribuir com o maior número de isolados, 15 no total, seguido pelo manejo M2 (horticultura) com 11, respectivamente. O segundo maior grupo é o grupo 12, com 24 representantes. O maior número de isolados foi obtido a partir do M2 (horticultura), com um total de 12. O terceiro grande grupo em número é o grupo 2 apresentando um total de 20 isolados. Destes, 14 pertencem ao manejo M4 (sistema

agropastoril) e os demais distribuídos entre os manejos M1 (plantio direto), M2 (horticultura) e M5 (mata nativa). Neste contexto, o grupo 4 e G11 também foram considerados um bom agrupamento, pois apresentaram um total de 16 e 14, respectivamente, sendo o que os isolados do manejo M4 foram predominantes no primeiro grupo (10 representantes), e que os isolados de manejo M2 no segundo (11 representantes) (TABELA 4).

O sistema agropastoril (M4) com 61 isolados foi o que apresentou maior diversidade morfológica, este resultados pode ser devido a presença de cobertura morta neste sistema, provenientes das plantas das pastagens e os restos culturais de lavouras comerciais, podem proporcionar um ambiente favorável à recuperação ou à manutenção das propriedades biológicas do solo (MENEZES e LEANDRO, 2004), estimulando a fauna edáfica, as raízes e a microflora do solo, o que permite manter o solo em equilíbrio e permanentemente protegido contra a degradação (FERREIRA *et al.*, 2010).

A segunda maior diversidade foi observada no M2 (horticultura) com 69 isolados, isto pode estar relacionado com a presença da rizosfera, onde a atividade microbiana é muito alta, tanto as populações de micro-organismos, quanto a sua diversidade, podem responder drasticamente às mudanças ambientais (SAITO, 2004).

## 5.2 ANÁLISE DE AGRUPAMENTO DOS PRODUTOS OBTIDOS POR ARDRA-PCR

A partir dos agrupamentos morfológicos foram selecionados 39 isolados para serem submetidos à técnica de ARDRA-PCR, entretanto nenhum dos isolados do M1 (platio direto) selecionados e alguns do M6 (plantio convencional) respondeu a técnica, seguindo com somente com 25 isolados pertencentes aos restantes dos manejos.

Após a amplificação, o produto do PCR obtido foi clivado com endonucleases do tipo II (FIGURA 3, 4, 5, 6), que cortam o DNA em pontos bem próximos ou dentro de suas sequencias de reconhecimento, produzindo fragmentos de restrição discretos e distintos no gel. A *Nde* I é uma enzima purificada a partir de *Neisseria denitrificans* (WATSON, 1982), a *Eco* RI foi isolada a partir de *Escherichia coli* (MODRICH e ZABEL, 1976) e a *Pst* I foi isolado a partir de *Providencia stuartii* (SMITH *et al.*, 1976)

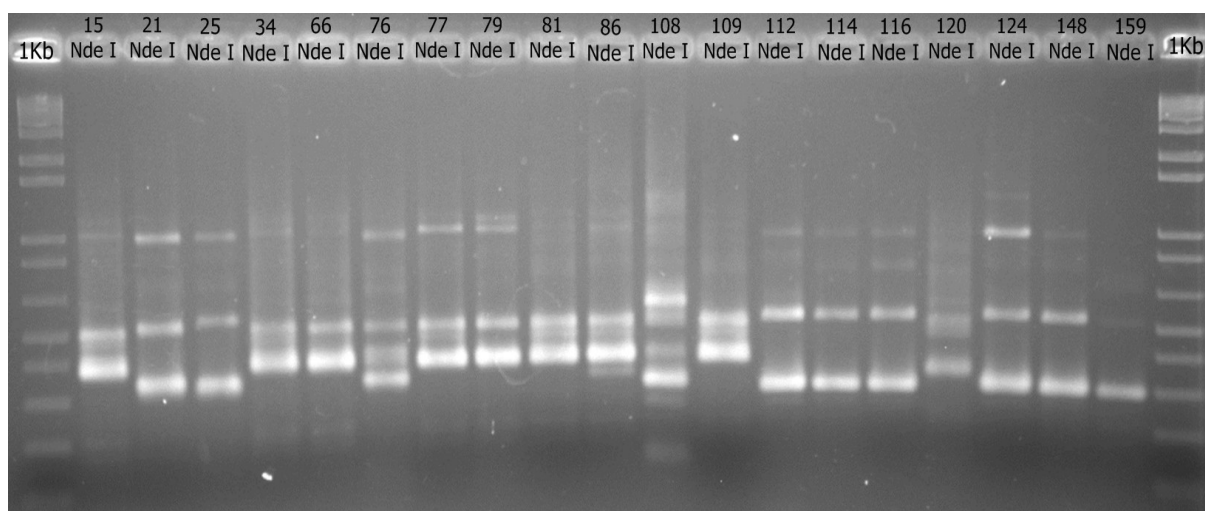


FIGURA 3: Perfil eletroforético de restrição da região ITS com a enzima *Nde* I.

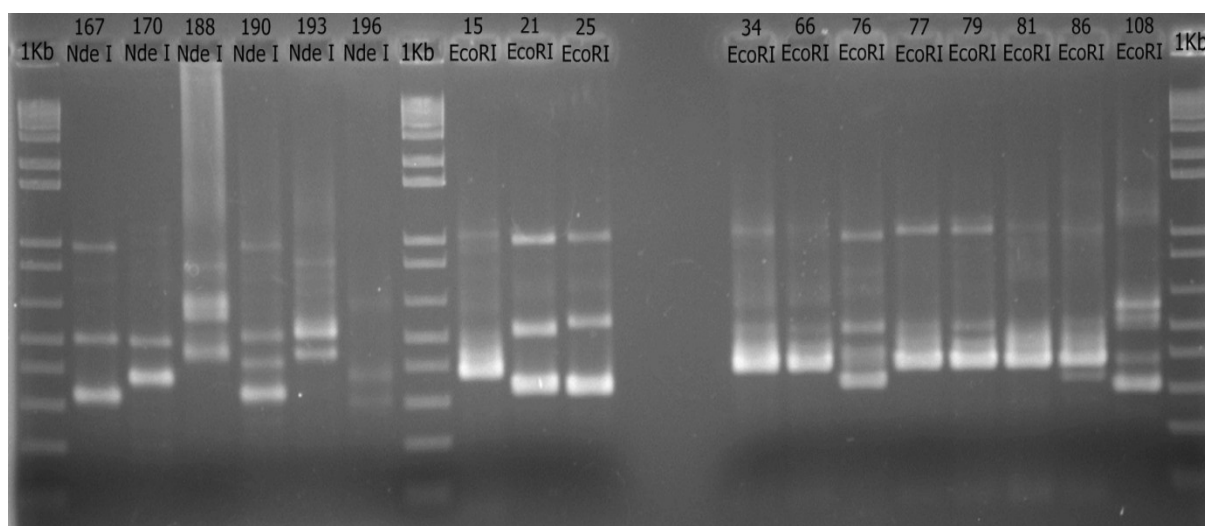


FIGURA 4: Perfil eletroforético de restrição da região ITS com a enzima *Nde* I e *Eco* RI.

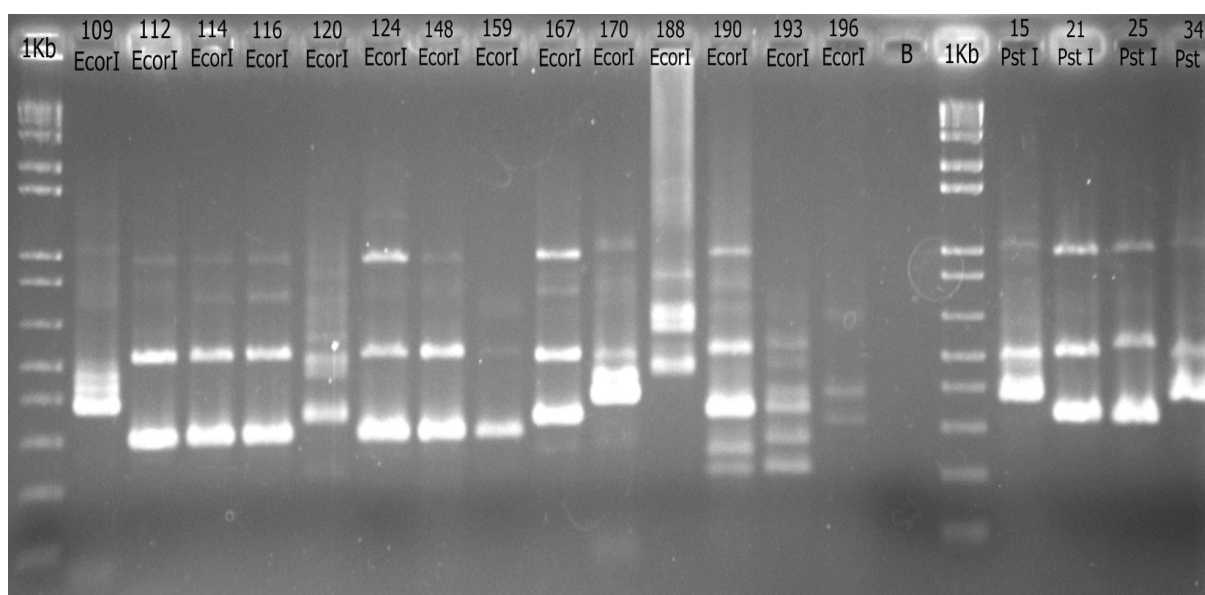


FIGURA 5: Perfil eletroforético de restrição da região ITS com a enzima *Eco* RI e *Pst* I.

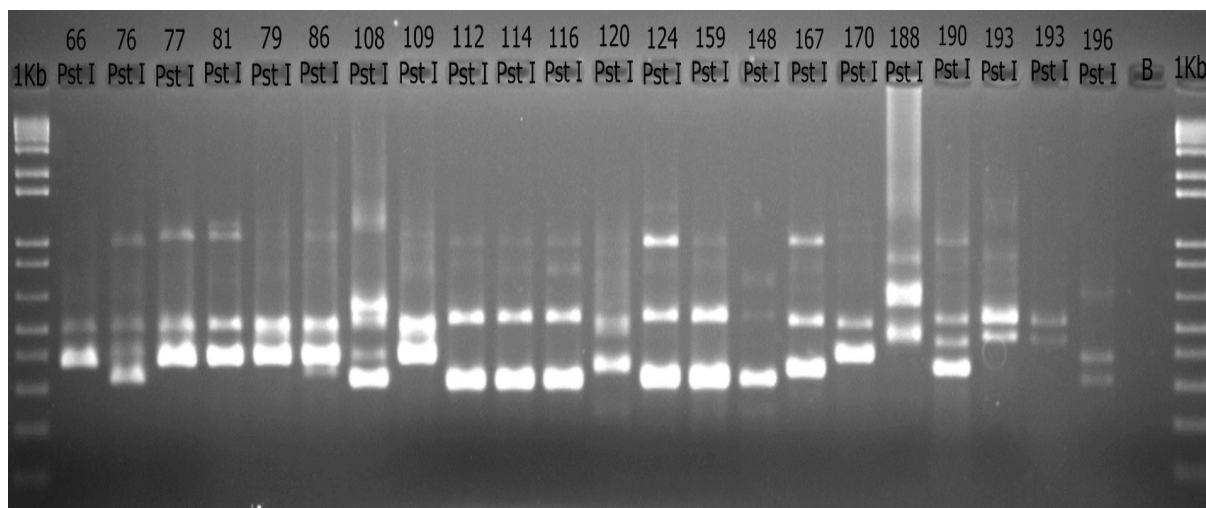


FIGURA 6: Perfil eletroforético de restrição da região ITS com a enzima *Pst* I.

Os 25 isolados foram agrupados no programa BioNumerics, pelo índice de Jaccard, com similaridade de 80%, formando um total 12 grupos (G) (TABELA 5; ANEXO B). O manejo M4 foi o que obteve maior número de perfis distribuídos entre os grupos, estando presente em 5 grupos, que supõe a presença de maior diversidade genética de isolados neste manejo, seguido do M2 com os isolados distribuídos entre 3 grupos. O M3 e M5 tiveram respectivamente os representantes em 2 e 3 grupos, enquanto o M6 teve somente um representante.

O grupo 3 foi o que apresentou maior número de indivíduos, oito no total, com isolados advindos dos manejos M2 e M3. O segundo maior grupo é o G8, com cinco representantes, sendo que esses são pertencentes ao M4. Os grupos 9 e 12 tem um total de dois isolados cada, pertencentes ao M2 e M4, respectivamente. Os restantes dos grupos tiveram perfis isolados (TABELA 5).

TABELA 4: Distribuição dos isolados provenientes de áreas sob diferentes manejos, segundo a classificação em grupos (G) obtida pela análise ARDRA-PCR

Grupos	Manejos de cultivo						Total
	M1	M2	M3	M4	M5	M6	
<b>G1</b>	0	0	0	0	1	0	1
<b>G2</b>	0	0	0	0	0	1	1
<b>G3</b>	0	5	3	0	0	0	8
<b>G4</b>	0	0	0	1	0	0	1
<b>G5</b>	0	0	0	1	0	0	1
<b>G6</b>	0	1	0	0	0	0	1
<b>G7</b>	0	0	0	0	1	0	1

TABELA 4: CONTINUAÇÃO

<b>G8</b>	0	0	0	5	0	0	5
<b>G9</b>	0	2	0	0	0	0	2
<b>G10</b>	0	0	1	0	0	0	1
<b>G11</b>	0	0	0	1	0	0	1
<b>G12</b>	0	0	0	1	1	0	2
<b>Total</b>	0	8	4	9	3	1	25

\*Grupos obtidos a partir do agrupamento de restrição de ARDRA-PCR, representados no ANEXO B. M1 – Plantio Direto; M2 – Horticultura; M3 – Pastagem; M4 – Sistema Agropastoril; M5 – Mata Nativa; M6 – Plantio Convencional.

A metodologia de ARDRA tem sido aplicada para diversos estudos de diversidade microbiana, principalmente de micro-organismos associadas a vegetais ou a diferentes solos (OVREAS e TORSVIK, 1998; CHELIUS e TRIPLETT, 2001; LAGACE *et al.*, 2004), diversidade genética de bactérias degradadoras de pesticidas (DESAINT *et al.*, 2000) e caracterização de bactérias diazotróficas (CRUZ *et al.*, 2001).

Azevedo (1998b) analisou os perfis de restrição da região intergênica 16S-23S rDNA de 71 estirpes de *Azospirillum amazonense*, sendo observado no nível intraespecífico, grande diversidade genética entre essas estirpes. Em um estudo semelhante Reis Junior *et al.* (2006) avaliaram a diversidade intraespecífica de isolados de *Azospirillum amazonense* isolados de *Brachiaria* ssp. utilizando a análise de restrição da região intergênica 16S-23S rDNA, separou as estirpes estudadas dois grupos, com 56% de similaridade. Em outro estudo, Wu *et al.*, (2006) desenvolveram um método baseado em ARDRA-PCR para identificar importantes espécies do gênero *Bacillus*. Para isto foi um par de primers grupo-específico para amplificar o gene 16S de *Bacillus* mésofilos, aeróbios e formadores de esporos. O fragmento amplificado foi digerido com as enzimas restrição, onde foi possível diferenciar espécies de *Bacillus* de interesse.

### 5.3 ANÁLISE DE AGRUPAMENTOS OBTIDOS ATRAVÉS DE MORFOLOGIA E ARDRA-PCR

Os 25 isolados foram agrupados de acordo com seus perfis de ARDRA-PCR e suas características morfológicas no programa BioNumerics, pelo índice de Jaccard, com similaridade de 80% (TABELA 6; ANEXO C). De acordo com a distribuição dos isolados nos diferentes grupos, pode-se observar que o manejo M4 novamente foi o que teve maior

número de isolados distribuídos, estando presente em 5 grupos, seguido do M2 e M5 com os isolados distribuídos entre em 3 grupos cada. O manejo M3 teve seus isolados agrupados em 2 grupos.

O grupo 5 foi o que apresentou maior número de representantes (8), proveniente dos manejos M2 e M3. O segundo maior grupo é o grupo 8, com quatro representantes, sendo que esses são pertencentes ao M4. Os grupos 9, 10 e 12, apresentam dois isolados cada, onde os isolados dos grupos 9 e 10 pertencem aos manejos M4 e M2, respectivamente, e o grupo 12 é representado pelos manejos M4 e M5 (TABELA 6).

TABELA 5: Distribuição dos isolados provenientes de áreas sob diferentes manejos, segundo a classificação em grupos (G) obtida pelos perfis de ARDRA-PCR e características morfológicas

Grupos	Manejos de cultivo						Total
	M1	M2	M3	M4	M5	M6	
<b>G1</b>	0	0	0	0	1	0	1
<b>G2</b>	0	0	0	0	0	1	1
<b>G3</b>	0	0	0	1	0	0	1
<b>G4</b>	0	1	0	0	0	0	1
<b>G5</b>	0	5	3	0	0	0	8
<b>G6</b>	0	0	0	1	0	0	1
<b>G7</b>	0	0	0	0	1	0	1
<b>G8</b>	0	0	0	4	0	0	4
<b>G9</b>	0	0	0	2	0	0	2
<b>G10</b>	0	2	0	0	0	0	2
<b>G11</b>	0	0	1	0	0	0	1
<b>G12</b>	0	0	0	1	1	0	2
<b>Total</b>	0	8	4	9	3	1	25

\*Grupos obtidos a partir do agrupamento dos perfis de ARDRA-PCR e características morfológicas, representados no ANEXO C. M1 – Plantio Direto; M2 – Horticultura; M3 – Pastagem; M4 – Sistema Agropastoril; M5 – Mata Nativa; M6 – Plantio Convencional.

Os dois agrupamentos, tanto o de ARDRA-PCR quanto o com as características morfológicas mostraram resultados semelhantes e apontando o M4 como o de maior diversidade. Para comprovar esses dados foi feito o cálculo de índice de diversidade, utilizando o índice de Shannon-Weaver, considera igual peso entre as espécies raras e abundantes (MAGURRAN, 1988) e; o índice de Simpson que mede a probabilidade de dois



indivíduos, selecionados ao acaso na amostra, pertencer à mesma espécie (BROWER e ZAR, 1984).

TABELA 6: Índices de diversidade, estimados pela tipagem morfológica e genética de isolados obtidos de solos de diferentes manejos de cultivo.

<b>Manejo de cultivo</b>	<b>Índice de Shannon-Weaver</b>	<b>Índice de Simpson</b>
M2 – horticultura	0,9003	0,5313
M3 – pastagem	0,5623	0,375
M4 – sistema agropastoril	1,427	0,716
M5 – mata nativa	1,099	0,6667
M6 – plantio convencional	0	0

Com base na Tabela 7, pode-se observar que os índices apontam o manejo M4 (sistema agropastoril) como tendo a maior diversidade, com 1,427 para o índice de Shannon e 0,716 para o índice de Simpson. Observa-se também que o M5 (mata nativa) foi o que apresentou a segunda maior diversidade, seguido do manejo M2 (horticultura) e M3 (pastagem), nesta ordem. O manejo M6 apresentou valor igual à zero, isto é devido ao fato de que somente um isolado desse manejo passou pela caracterização genética, não havendo forma de comparação.

Neiverth (2012) avaliando a diversidade de micro-organismos em diferentes classes de solo e manejos de cultivo constatou que o manejo de monocultivo de cana-de-açúcar (alto teor de P no solo e aplicação de vinhaça) foi o que apresentou os maiores índices de diversidade para os grupos morfológicos quanto genotípicos. Pereira (2003), em estudos sobre a diversidade entre amostras obtidas de florestas e áreas cultivadas, obteve uma maior diversidade bacteriana e dominância de um grupo nas amostras provenientes de áreas de floresta.

## 6 CONCLUSÕES

- Os cultivos com horticultura (M2) e com plantio direto (M1) foram os manejos que apresentaram, respectivamente, o maior número de isolados e o menor número de isolados obtidos;
- O sistema agropastoril (M4) destacou-se por apresentar maior diversidade morfológica, seguido sem diferença significativa pelo manejo de horticultura apontando para a importância do pouco revolvimento do solo na preservação da microbiota da rizosfera;
- O manejo de plantio direto (M1) e plantio convencional (M6) foram os que apresentaram menor diversidade morfológica. O que aponta para a necessidade de uma nova amostragem com a presença das raízes e seus exudatos na rizosfera, a fim de comparar as duas coletas e verificar se o perfil da diversidade das comunidades microbianas obtido anteriormente se confirma;
- A técnica de ARDRA-PCR da região intergênica 16S-23S do rDNA foi eficiente no estudo de diversidade intraespecífica, mas devido ao fato de que somente um pequeno número de isolados foram caracterizados pela técnica e de que nenhum dos isolados pertencentes ao manejo de plantio direto ter respondido a mesma, há necessidade de se testar outros marcadores moleculares a fim de se obter resultados mais precisos;
- Em relação aos índices de diversidade, o manejo com sistema agropastoril novamente foi o que apresentou maior diversidade, seguido pela mata nativa apontando para a importância da presença do exsudatos no momento da coleta de amostragem.
- De modo geral, os resultados obtidos apontam para o sistema agropastoril (M4) como sendo um tipo de manejo conservacionista do ponto de vista da diversidade morfo-genética realizada até então neste trabalho;

## 7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALENCAR, E. Complexos agroindustriais. 2.ed. Lavras: **UFLA/FAEPE**, 90p., 2000.
- ALVES, S. B.; LEUCONA, R. E. Epizootiologia aplicada ao controle microbiano de insetos. In: ALVES, S. B. (Ed.). Controle microbiano de insetos. 2.ed. Piracicaba: **FEALQ**, cap. 5, p. 97-163, 1998.
- ALVES, S. B.; LOPES, R. B.; PEREIRA, R. M.; TAMAI, M. A. O controle microbiano na América Latina. In: ALVES, S. B.; LOPES, R. B. (Ed.). Controle Microbiano de Pragas na América Latina: avanços e desafios. Piracicaba: **FEALQ**, cap. 1, p. 21-110, 2008.
- AMARA, M. A. T.; DAHDOH, M. S. A. Effect of inoculation with plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR) on yield and uptake of nutrients by wheat grown on sandy soil. **Egypt J. Soil**, vol. 37, p. 467-484, 1997.
- ANDRADE, D. S.; HAMAKAWA, P. J. Estimativa do número de células viáveis de rizóbio no solo e em inoculantes por infecção em plantas. In: HUNGRIA, M.; ARAÚJO, R. S. (Eds). Manual de métodos empregados em estudos de microbiologia agrícola. Brasília: **EMBRAPA-SPI**, p.63-94, 1994.
- ARAUJO, F. F.; GUABERTO, L. M.; MOREIRA, A. L. L.; SANTOS, S. T.; AGOSTINI, E. A. T.; SANTOS, E. A.; HIGAKI, W. A.. Produção de auxinas, fosfatases e antagonismo a fitopatígeno por rizobactérias e correlação com o crescimento da alface. In: Congresso Brasileiro de ciências do solo. Uberlândia, **Anais Uberlândia**, Center convention, 2011.
- ARAUJO, F. F.; HENNING, A.; HUNGRIA, M. Phytohormones and antibiotics produced by *Bacillus subtilis* and their effects on seed pathogenic fungi and on soybean root development. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, Dordrecht, vol. 21, p. 1639-1645, 2005.
- ARAUJO, F. F.; PEDROSO, R. A. B. Interação de *Bacillus sp.* com a rizosfera de três espécies de plantas forrageiras. **Biosci. J.**, vol. 29, n. 1, p. 152-158, 2013.
- ASGHAR, H. N.; ZAHIR, Z. A.; ARSHAD, M.; KHALIG, A. Plant growth regulating substance in the rhizosphere; microbial production and functions. **Adv. Agron.**, vol. 62, p. 146-151, 2002.
- ASSUMPÇÃO, L. de C.; LACAVA, P. T.; DIAS, A. C. F.; AZEVEDO, J. L. de; MENTEN, J. O. M. Diversidade e potencial biotecnológico da comunidade bacteriana endofítica de sementes de soja. **Pesq. agropec. bras.**, vol. 44, n. 5, p. 503-510, 2009.
- ATKINSON, D.; WATSON, C. A. The Beneficial Rhizosphere: a dynamic entity. **Applied Soil Ecology**, vol. 15, n. 2, p. 99-104, 2000.
- AZEVEDO, J. L. Biodiversidade Microbiana e Potencial Biotecnológico. In: MELO, I. S.; AZAVEDO, J. L. Ecologia Microbiana, Jaguariúna: **EMBRAPA-CNPMA**, p. 445-461, 1998a.

AZEVEDO, M. S. Influência do solo e da planta hospedeira sobre a diversidade gênica de isolados de *Azospirillum amazonense* associados às raízes de arroz, milho e sorgo. **Dissertação de Mestrado**. Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 110p., 1998b.

BAIS, H. P.; LOYOLA, V. M. V.; FLORES, H. E, VIVANCO, J. M. Root specific metabolism: the biology and biochemistry of underground organs. **In vitro Cell Dev Biol Plant**, vol. 37, p. 730–741, 2001.

BALATTI, A. P. Producción de inoculantes para Leguminosas: tecnologia de las fermentaciones aplicada a los géneros *Rizhobium* y *Bradyrhizobium*. **La Plata**, 152 p., 1992.

BALDANI, V. Protocolo para a análise da qualidade e da eficiência agrônômica de inoculantes, estirpes e outras tecnologias relacionadas ao processo de fixação biológica do nitrogênio em plantas não leguminosas. In. XIII Reunião da Rede de Laboratórios para Recomendação, Padronização e Difusão de Tecnologia de Inoculantes Microbianos de Interesse Agrícola, RELARE. **Anais**. Londrina: Embrapa Soja. Documentos 290, p 124-142, 2007.

BARROS, F. C.; SAGATA, E.; FERREIRA, L. C. de C.; JULIATTI, F. C. Indução de resistência em plantas contra fitopatógenos. **Biosci. J.**, vol. 26, n. 2, p. 231-239, 2010.

BERGE, O.; FAGES, J.; MULARD, D.; BALANDREAU, J. Effects of inoculation with *Bacillus circulans* and *Azospirillum lipoferum* on crop-yield in field grown maize. **Symbiosis**, vol. 9, p. 259–266, 1990.

BETTIOL, W.; SAITO, M. L.; BRANDÃO, M. S. Controle da ferrugem do cafeeiro com produtos à base de *Bacillus subtilis*. **Summa Phytopathologica**, vol. 20. p. 119-122, 1994.

BROWER, J. E.; ZAR, J. H. Field & laboratory methods for general ecology. **W.C. Brown Publishers**, Boston, 1984.

BROWN, N. L.; SMITH, M. The mapping and sequence determination of the single site in  $\Phi$ X174am3 replicative form DNA cleaved by restriction endonuclease PstI. **FEBS Lett**, vol. 65, p. 284-287, 1976.

BRUIJN, F. Use of repetitive (repetitive extragenic palindromic and entero-bacterial repetitive intergeneric consensus) sequences and the polymerase chain reaction to fingerprint the genomes of *Rhizobium meliloti* isolates and other soil bacteria. **Applied and Environmental Microbiology**, vol. 58, p. 2180-2187, 1992.

BUCHANAN, R. E.; GIBBONS, N. G. Bergey's Manual of Determinative Bacteriology, 8.ed. **Baltimore: The Willians & Wilkens**, 1268 p.,1975

BUCHENAUER, H. Biological control of soil-borne diseases by rhizobacteria. **Journal of Plant Disease and Protection**, vol. 105, n. 4, p. 329-348, 1998.

BUCKLAND, S. T.; ANDERSON, D. R.; BURNHAM, K. P.; LAAKE, J. L.; BORCHERS, D. L; THOMAS, L. Introduction to distance sampling-estimating abundance of biological populations. **Oxford University Press**. Oxford: 432 p., 2001.

CADETE, L. L. Potencial promoção de crescimento vegetal por bactérias associadas ao feijão caupi (*Vigna unguiculata*), 2009.

CAMPANHOLA, C.; BETTIOL, W. Panorama sobre o uso de agrotóxicos no Brasil. In: CAMPANHOLA, C.; BETTIOL, W. (ed.). **Métodos alternativos de controle fitossanitário**. Jaguariúna. Embrapa Meio Ambiente, P. 13-51, 2003.

CAMPOS, A. K.; MOTA, M. A. ; ARAUJO, J. V.; CECOM, P. R. Atividade predatória, crescimento radial e esporulação de fungos predadores de nematóides *Monacrosporium* ssp, submetidos a criopresevação. **Ciência Rural**, vol. 34, n. 2, p. 465-469, 2004.

CAPALBO, D. M. F.; VILAS-BÔAS, G. T.; ARANTES, O. M. N.; SUZUKI, M. T. *Bacillus thuringiensis*. **Revista Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**, vol. 34, p. 69-85, 2005.

CARVALHO, P. C. de F.; ANGHINONI, I.; MORAES, A. de; SOUZA, E. D. de; SULC, R. M.; LANG, C. R.; FLORES, J. P. C.; LOPES, M. L. T.; SILVA, J. L. S. da; CONTE, O.; WESP, C. de L.; LEVIEN, R.; FONTANELI, R. S.; BAYER, C. Managing grazing animals to achieve nutrient cycling and soil improvement in no-till integrated systems. **Nutrient Cycling in Agroecosystems**, vol. 88, p. 259-273, 2010.

CARVALHO, Y. Densidade e atividade dos microrganismos do solo em plantio direto e convencional, na região de Carambei – PR. **Dissertação de Mestrado**. Universidade Federal do Paraná, 108p., 1997.

CASTRO, O. M.; PRADO, H.; SEVERO, A. C. R.; CARDOSO, E. J. B. N. Avaliação da atividade de microrganismos do solo em diferentes sistemas de manejo de soja. **Scientia Agricola**, vol. 50, p. 212-219, 1993.

CATTELAN, A.J.; HARTEL, P.G.; FUHRMANN, J.J. Screening for plant growth-promoting rhizobacteria to promote early soybean growth. **Soil Science Society of America Journal**, vol. 63, p. 1670-1680, 1999.

CAVALEIRO, H.; PRAÇA, L. B.; MARTINS, E. S.; MEDEIROS, P. T.; GOMES, A. A. M. M.; MONNERAT, R. G. Novas estirpes de *Bacillus thuringiensis* e *Bacillus sphaericus* testadas contra larvas de insetos da ordem *Lepidoptera* e *Diptera*. Brasília, DF: **Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia**, 22p. 2005.

CHANWAY, C. P.; SHISHIDO, M.; NAIRN, J.; JUNGWIRTH, S.; MARKHAM, J.; XIAO, G.; HOLL, F. G. Endophytic colonization and field responses of hybrid spruce seedlings after inoculation with plant growth-promoting rhizobacteria. **For. Ecol. Manag.**, vol. 133, p. 81-88, 2000.

CHELIUS, M. K.; TRIPLETT, E. W. The diversity of archaea and bacteria in association with the roots of *Zea mays* L. **Microbial Ecology**, New York, vol. 41, n. 3, p. 252-263, 2001.

CHEN, C.; BAUSKE, E. M.; MUSSON, G.; RODRIGUEZKABANA, R.; KLOEPPER, J. W. In: Biological control of *Fusarium* on cotton by use of endophytic bacteria. **Biol. Control**, vol. 5, p. 83-91, 1994.

CHEN, Y. X.; MEI, R.H.; LU, S.; LIU, L.; KLOEPPER, J. W. The use of yield increasing bacteria (YIB) as plant growth-promoting rhizobacteria in Chinese agriculture. In: UTKEHEDE, R. S.; GUPTA, V. K. (eds). **Management of Soil-Borne Disease**. New Delhi, p. 165–184, 1996.

COELHO, L. F. In: Interação de *Pseudomonas spp.* e de *Bacillus spp.* com diferentes rizosferas. **IAC – Instituto Agrônomo**. Campinas – SP. 2006.

COSTA, C. P.; FERREIRA, M. C. Preservação de micro-organismos: revisão. **Revista de Microbiologia**, São Paulo, vol. 22, n. 3, p. 263-268, 1991.

CRUZ, L. M.; DE SOUZA, E. M.; WEBER, O. B.; BALDANI, J. I.; DOBEREINER, J.; PEDROSA, F. D. 16S ribosomal DNA characterization of nitrogen-fixing bacteria isolated from banana (*Musa spp.*) and pineapple (*Ananas comosus* (L.) Merrill). **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, vol. 67, n. 5, p. 2375-2379, 2001.

CUNHA, J. F.; PICOLI, E. A. T.; ALFENAS, A. C.; GONÇALVES, R. C.. Efeito “in vitro” de antibióticos e rizobactérias no controle de bactérias fitopatogênicas ao *Eucalyptus spp.* **Revista Árvore**, vol. 30, n. 1, p. 76-81, 2006.

DESAINT, S.; HARTMANN, A.; PAREKH, N. R.; FOURNIER, J. C. Genetic diversity of carbofuran-degrading soil bacteria. **FEMS Microbiology Ecology**, Amsterdam, vol. 34, n. 2, p. 173-180, 2000.

DIAS, A. C. F. Diversidade de Bactérias do sedimento de manguezal da Ilha do Cardoso Cananéia. **Dissertação de Mestrado**. Universidade de São Paulo, 2008.

DIAS, S. C.; SAGARDOY, M. A.; SILVA, S. F.; DIAS, J. M. C. S. Characterization and pathogenic evaluation of *Bacillus thuringiensis* e *Bacillus sphaericus* isolates from Argentina soils. **Biocontrol Journal**, vol. 44, p. 59-71, 1999.

DILEEP, C.; KUMAR, B. S. D.; DUBE, H. C.; Promotion of plante growth and yield by two rhizoplane fluorescent *pseudomonas*. **Indian Journal of Experimental Biology**, vol. 36, p. 399-402, 1998.

DOBBELAERE, S.; VANDERLEYDEN, J.; OKON, Y. Plant growth-promoting effects of diazotrophs in the rhizosphere. **Critical Reviews in Plant Sciences**, vol. 22, n. 2, p. 107 -149, 2003.

ENEBACK, S. A.; CAREY, W. A. Evidence for induced systemic protection to fusiform rust in loblolly pine by plant growth promoting rhizobacteria. **Plant Disease**, vol. 84, p. 306-308, 2000.

ESTABROOK, E. M.; YODER, J. I. Plant-plant communications: rhizosphere signaling between parasitic angiosperms and their hosts. **Plant Physiol**, vol. 116, p. 1–7, 1998.

EUZÉBY, J. P. List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature. **Disponível em:** <http://www.bacterio.net/bacillus.html>. Acessado: 01 de novembro de 2014.

FERREIRA, J. H. S.; MATTHEE, F. N.; THOMAS, A. C. Biological control of *Eutypa lata* on grapevine by an antagonistic strain of *Bacillus subtilis*. **Phytopathology**, vol. 81, p. 283-287, 1991.

FERREIRA, P. A.; PEREIRA, J. R.; ALENCAR, E.; SANTANA, A. C. Estado e agricultores familiares: uma análise interpretativa sobre o desenvolvimento rural no Sul de Minas Gerais. **RESR**, vol. 47, n. 03, p. 767-792, 2009.

FERREIRA, R. R. M.; TAVARES FILHO, J.; FERREIRA, V. M. Efeitos de sistemas de manejo de pastagens nas propriedades físicas do solo. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, vol. 31, n. 4, p. 913-932, 2010.

FILHO, R. L.; FERRO, H. M.; PINHO, R. S. C. de. Controle biológico mediado por *Bacillus subtilis*. **Revista Trópica – Ciências Agrárias e Biológicas**, vol. 4, n. 2, p. 12, 2010.

FONSECA, M. C. C.; ZAGO, V. C. P.; FERREIRA, E. P. B.; CÂMARA, A. F. S.; RUMJANEK, N. G. Isolamento e caracterização morfológica de *Pseudomonas* spp. fluorescentes nativas em sistemas de produção agrícola. **Comunicado Técnico**. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, Embrapa Agrobiologia. Seropédica, Rio de Janeiro: n.43, p. 1-4, 2000.

FONSECA, S. da. Propriedades físicas, químicas e microbiológicas de um Latossolo Vermelho-Amarelo sob eucalipto, mata natural e pastagem. **Dissertação de Mestrado**. Universidade Federal de Viçosa, Viçosa-MG, 78p. 1984.

FREITAS, S. S.; PIZZINATTO, M. A. Ação de rizobactérias sobre a incidência de *Colletotrichum gossypii* e promoção de crescimento em plântulas de algodoeiro (*Gossypium hirsutum*) **Sum. Phytopathol.**, vol. 23, p. 36-41, 1997.

FRITZ, L. L.; BERLITZ, D. L.; MACEDO, V. R. M.; MACHADO, V.; FIUZA, L. M. Frequência de *Bacillus* spp. em solos de diferentes sistemas de cultivo de arroz irrigado em Cachoeirinha, RS. **Bragantia**, Campinas, vol. 69, n. 2, p. 405-412, 2010.

GARCÍA, L. J. A.; PROBANZA, A.; RAMOS, B.; PALOMINO, M. R.; MAÑERO, F. J. G. Effect of inoculation of *Bacillus licheniformis* on tomato and pepper. **Agronomie** vol. 24, p. 169-176, 2004.

GARDENER, B. B. M. Ecology of *Bacillus* and *Paenibacillus* spp. In Agricultural Systems. Symposium: The Nature and Application of Biocontrol Microbes: *Bacillus* spp. **Phytopathology**, vol. 94, p. 1252-1258, 2004.

GILL, S. S.; COWLES, E. A.; FRANCIS, V. Identification, isolation, and cloning of a *Bacillus thuringiensis* CryIAc Toxin-binding Protein from the midgut of the lepidopteran Insect *Heliothis virescens*. **The Journal of Biological Chemistry**, vol. 270, p. 27277- 27282, 1995.

GRIFONI, A; BAZZICALUPO, M.; DI SERI, C.; FANCELLI, S.; FANI, R. Identification of *Azospirillum* strains by restriction fragment length polymorphism of 16S rDNA and of the histidine operon. **FEMS Microbiological Letters**, vol. 127, p. 85-91, 1995.

HAAS, D.; DÉFAGO, G. Biological control of soil-borne pathogens by fluorescent pseudomonads. **Nature Reviews in Microbiology**, vol. 3, p. 307-319, 2005.

HABIB, M. E. M.; ANDRADE, C. F. S. Bactérias entomopatogênicas. In: ALVES, S. B. (Ed.) **Controle microbiano de insetos**. Piracicaba: FEALQ, p.383-446, 1998.

HANDELSMAN, J.; RAFFAEL, S.; MESTER, E. H.; WUNDERLICH, L.; CRAU, C. R. Biological control of damping-off of alfalfa seedlings with *Bacillus cereus* UW85. **Appl Environ Microbiol**, vol. 56, p. 713–718, 1990.

HOFTE, M.; BOELEN, J.; VERSTRAETE, W. Seed protection and promotion of seedling emergence by the plant growth beneficial *Pseudomonas* strains 7NSK2 and ANPIS. **Soil Biology and Biochemistry**, vol. 23, n. 5, p. 407-410, 1991.

HULTON, C. S. J.; HIGGINS, C. F.; SHARP, P. M. ERIC sequences: a novel family of repetitive elements in the genomes of *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium* and other enterobacteria. **Molecular Microbiology**, vol. 5, p. 825-762, 1991.

HUNGRIA, M.; ARAUJO, R., S. (Ed.) Manual de métodos empregados em estudos de microbiologia agrícola, Brasília: **EMBRAPA-CNPAF**, 542p., 1994.

HUNGRIA, M.; SILVA, K. Manual de Curadores de Germoplasma – Micro-organismos: Rizóbios e Bactérias Promotoras do Crescimento Vegetal. Brasília, DF: **Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia**, 2011.

INGRAM, L. J.; STAHL, P. D.; SCHUMAN, G. E.; BUYER, J. S.; VANCE, G. F.; GANJEGUNTE, G. K.; WELKER, J. M.; DERNER, J. D. Grazing impacts on soil carbon and microbial communities in a mixed-grass ecosystem. **Soil Science Society of America Journal**, vol. 72, p. 939-948, 2008.

JAGADEESH, K. S.; KRISHNARAJ, P. U.; KULKARNI, J. H. Suppression of deleterious bacteria by rhizobacteria and subsequent improvement of germination and growth of tomato seedlings. **Current Science**, vol. 91, p. 1458-1459, 2006.

JONES, C. M.; THIES, J. E. Soil microbial community analysis using two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis of the bacterial ribosomal internal transcribed spacer regions. **Journal of Microbiological Methods**, vol. 69, n. 2, p. 256- 267, 2007.

JUNIOR, M. E. Controle biológico de insetos pragas. Anais. I Seminário Mosaico Ambiental: Olhares sobre o ambiente, 2011.

KASCHUK, G.; ALBERTON, O.; HUNGRIA, M. Three decades of soil microbial biomass studies in Brazilian ecosystems:Lessons learned about soil quality and indications for improving sustainability. **Soil Biology & Biochemistry**, vol. 42, p. 1–13, 2010.

KATO, E. E. Mapeamento e monitoramento do conhecimento dos solos no ensino fundamental e médio. **Dissertação de Mestrado**. Universidade de Mogi das Cruzes, 2006.



KLAPPENBACH, J. A.; DUNBAR, J. M.; SCHIMIDT, T. M. rRNA operon copy number reflects ecological strategies of bacteria. **Appl Environ Microbiol**, vol. 66, p. 1328–1333, 2000.

KLOEPPER, J. W. Current status and future trends in biological research and development in the U.S. **Anais do International Symposium on clean agriculture**, Japan, vol. 1, p. 49-52, 1997.

KLOEPPER, J. W.; SHER, F. M.; LALIBERTE, M.; TIPPING, B. Emergence promoting rhizobacteria: description and implications for agriculture. Swinburn, T.R. (ed.) In: Iron, siderophores and plant disease. New York, **Plenum Press.**, p. 155-164, 1986.

KOEUTH, T.; VERSALOVIC, J.; LUPSKI, J. R. Differential subsequence conservation of interspersed repetitive *Streptococcus pneumoniae* BOX elements in diverse bacteria. **Genome Research**, vol. 5, p. 408-418, 1995.

KUSS, A. V. Fixação de nitrogênio por bactérias diazotróficas em cultivares de arroz irrigado. **Tese Doutorado**. Universidade Federal de Santa Maria, RS, 110p., 2006.

LAGACE, L.; PITRE, M.; JACQUES, M.; ROY, D. Identification of the bacterial community of maple sap by using amplified ribosomal DNA (rDNA) restriction analysis and rDNA sequencing. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, vol. 70, n. 4, p. 2052-2060, 2004.

LANE, D. J.; PACE, B.; OLSEN, G. J.; STAHL, D. A.; SOGIN, M. L.; PACE, N. R. Pace. Rapid determination of 16S ribosomal RNA sequences for phylogenetic analyses. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, vol. 82, p. 6955-6959, 1985.

LITAIFF, E. de C.; TADEI, W. P.; PORTO, J. I. OLIVEIRA, I. M. de A. Analysis of toxicity on *Bacillus sphaericus* from amazonian soils to *Anopheles darlingi* and *Culex quinquefasciatus* larvae. **Acta Amaz.**, vol. 38, n. 2, 2008.

LAZZARETI, E.; BETTIOL, W. Tratamento de sementes de arroz, trigo, feijão e soja com um produto formulado a base de células e de metabólitos de *Bacillus subtilis*. **Scientia Agricola**, Piracicaba, vol. 54, n.1 p. 89-96, 1997.

LUZ, W. C. Controle microbiológico do mal-do-pé do trigo pelo tratamento de sementes. **Fitopatologia Brasileira**, vol. 13, p. 82-85, 1993.

MAFIA, R. G.; ALFENAS, A. C.; MAFFIA, L. A., FERREIRA, E. M.; BINOTI, D. H. B.; MAFIA, G. M. V. Plant growth promoting rhizobacteria as agents in the biocontrol of eucalyptus mini-cutting rot. **Tropical Plant Pathology**, vol. 34, n. 1, p. 010-017, 2009.

MAGURRAN, A. E. Ecological Diversity and Its Measurement. Princeton: **Princeton University Press**, 1988.

MAHUKA, G. S.; JARA, C.; HENRIQUEZ, M. A. CASTELLANOS, G.; CUASQUER, J. Genotypic characterization of the common bean bacterial blight pathogens, *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* and *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* var. *fuscans* by rep-PCR

and PCR-RFLP of the ribosomal genes. **Journal of Phytopathology**, vol. 154, p. 35-44, 2006.

MARIANO, R. L. R.; SILVEIRA, E. B.; ASSIS, S. M. P.; GOMES, A. M. A.; NASCIMENTO, A. R. P.; DONATO, V. M. T. S. Importância de bactérias promotoras de crescimento e de biocontrole de doenças de plantas para uma agricultura sustentável. **Academia Pernambucana de Ciência Agrônômica**, vol. 1, p.89-111, 2004.

MARTIN B.; HUMBERT O.; CAMARA M.; GUENZI E.; WALKER J.; MITCHELL T.; ANDREW P.; PRUDHOMME M.; ALLOING G.; HAKENBECK R.; MORRISON D. A.; BOULNOIS G. J.; CLAVERY J. P. A highly conserved repeated DNA element located in the chromosome of *Streptococcus pneumoniae*. **Nucleic Acids Research**, vol. 20, p. 3479–3483, 1992.

MENEZES, L. A. S.; LEANDRO, W. M. Avaliação de espécies de coberturas do solo com potencial de uso em sistema de plantio direto. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, Goiás, vol. 34, n. 3, p. 173-180, 2004.

MILETTO, M.; BODELIER, P. L. E.; LAANBROEK, H. J. Improved PCR-DGGE for high resolution diversity screening of complex sulfate-reducing prokaryotic communities in soils and sediments. **Journal of Microbiological Methods**, vol. 70, n. 1, p. 103-111, 2007.

MODRICH, P.; ZABEL, D. EcoRI endonuclease. Physical and catalytic properties of the homogenous enzyme. **J. Biol. Chem.**, v. 251, p. 5866-5874, 1976.

MONTEIRO, A. L. R.; CAMPOS NETO, J. R. M.; BITU, P. I. M.; ROZARIO, W. C.; OLIVEIRA, L. J. M. G.; RODRIGUES, A. A. C. Potencial antagonista de *Bacillus* spp. sob diferentes métodos de avaliação in vitro no controle de *Fusarium oxysporum* f. sp. *Lycopersici*. **Tropical Plant Pathology**, vol. 38, agosto 2012

MONTEIRO, L. Produção de substâncias biotivas de *Bacillus* spp. contra *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de Pernambuco, 2002.

MORANDI, M. A. B.; BETTIOL, W. Controle Biológico de Doenças de Plantas no Brasil. In: BETTIOL, W.; MORANDI, M. A. B. (Eds) Biocontrole de doenças de plantas: uso e perspectivas. Jaguariúna, **Embrapa Meio Ambiente**, pp 7-15, 2009.

MOREIRA, A. L. L.; ARAÚJO, F. F. Bioprospecção de isolados de *Bacillus* spp. como potenciais promotores de crescimento de *Eucalyptus urograndis*. **Revista Árvore**, Viçosa-MG, v.37, n.5, p.933-943, 2013.

NARDI, S.; CONCHERI, G.; PIZZEGHELLO, D.; STURARO, A.; RELLA, R.; PARVOLI, G. Soil organic matter mobilization by root exudates. **Chemosphere**, vol. 5, p. 653–658, 2000.

NAVARRO, E.; SIMONET, P.; NORMAND, P.; BARDIN, R. Characterization of natural populations of *Nitrobacter* sp. using PCR/RFLP analysis of the ribosomal intergenic spacer. **Arch. Microbiol.** vol. 157, p. 107–115, 1992

NEIVERTH, W. Diversidade morfológica e genética de rizobactérias endofíticas obtidas de solos de diferentes classes e manejos de cultivo. **Dissertação de Mestrado**. Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Campus de Marechal Cândido Rondon, 105 p., 2012.

OVREAS, L.; TORSVIK, V. Microbial diversity and community structure in two different agricultural soil communities. **Microbial Ecology**, New York, vol. 36, n. 3, p. 303-315, 1998.

PAL, K. K.; GARDENER, B. M. Biological Control of Plant Pathogens. **The Plant Health Instructor**, 2006.

PEIXOTO NETO, P. A. S.; AZEVEDO, J. L.; ARAÚJO, W. L. Micro-organismos endofíticos. **Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**, Brasília, vol. 29, p. 62-77, 2002.

PEIXOTO, A. R. Controle biológico da murcha bacteriana do tomateiro, por *Pseudomonas* spp. fluorescentes. **Ciência Rural**, vol. 27, n. 1, p. 153-160, 1997.

PEREIRA, A. A.; HUNGRIA, M.; FRANCHINI, J. C.; KASCHUK, G.; CHUEIRE, L. M. de O.; CAMPO, R. J.; TORRES, E. Variações qualitativas e quantitativas na microbiota do solo e na fixação biológica do nitrogênio sob diferentes manejos com soja. **R. Bras. Ci. Solo**, vol. 31, p. 1397-1412, 2007.

PEREIRA, R. M. Diversidade bacteriana de um latossolo sob cultivo intensivo e floresta através da análise metagenômica. **Dissertação de Mestrado**, Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, 75p., 2003.

PERONDI, N. L.; DA LUZ W. C.; THOMAS, R. Controle microbiológico da giberela do trigo. **Fitopatologia Brasileira**, vol. 21, p. 243-249, 1996.

PICARD, C.; BOSCO, M. Genotypic and phenotypic diversity in populations of plantprobiotic *Pseudomonas* spp. colonizing roots. **Naturwissenschaften**, vol. 95, n.1, p.1-16, 2008.

POLANCZYK, R. A. Estudos de *Bacillus thuringiensis* Berliner visando o controle de *Spodoptera frugiperda* (J.E.Smith). **Tese de Doutorado**. Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2004.

POLANCZYK, R. A.; VALICENTE, F. H.; BARRETO, M. R. Utilização de *Bacillus thuringiensis* no controle de pragas agrícolas na América Latina. In: ALVES, S. B.; LOPES, R. B. (Ed.). Controle Microbiano de Pragas na América Latina: avanços e desafios. Piracicaba: FEALQ, cap.4, p.111-136, 2008.

PRAÇA, L. B.; BATISTA, A. C.; MARTINS, E. S.; SIQUEIRA, C. B.; DIAS, D. G. S.; GOMES, A. C. M. M., FALCÃO, R.; MONNERAT, R. G. Estirpes de *Bacillus thuringiensis* efetivas contra insetos das ordens Lepidoptera, Coleoptera e Diptera. **Pesq. agropec. bras.**, Brasília, vol. 39, n. 1, p. 11-16, 2004.

PRAYITNO, J.; ROLFE, B. Characterization of endophytic diazotroph bacteria isolated from rice. **HAYTI Journal of Biosciences**, vol. 17, n. 2, p. 73-78, 2010.

PUSEY, P. L.; WILSON, C. L.; HOTCHKISS, M. W.; FRANKLIN, J. D. Compatibility of *Bacillus subtilis* for postharvest control of peach brown rot with commercial fruit waxes, dicloran, and coldstorage conditions. **Plant Disease**, vol. 70, p. 587-590, 1986.

QUADROS, P. D. Diversidade e composição de comunidades microbianas de solos construídos e de solos sob diferentes manejos agrícolas. **Tese Doutorado**. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 127 p., 2013.

RAAIJMAKERS, J. M.; PAULITZ, T. C.; STEINBERG, C.; ALABOUVETTE, C. MOËNNE-LOCCOZ, Y. The rhizosphere: a playground and battlefield for soilborne pathogens and beneficial microorganisms. **Plant and Soil**, vol. 321, n. 2, p. 341-361, 2009.

RAMAMOORTHY, V.; VISWANATHAN, R.; RAGUCHANDER, T.; PRAKASAM, V.; SAMIYAPPAN, R. Induction of systemic resistance by plant growth promoting rhizobacteria in crop plants against pests and diseases. **Crop Protection**, vol. 20, p. 1-11, 2001.

RECHE, M. H. L. R.; FIUZA, L. M. Distribuição e densidade de bactérias em áreas subtropicais de cultivo de arroz irrigado no Brasil. **Brazilian Journal of Biology**, São Carlos, vol. 65, n. 3, p. 503-5011, 2005.

REIS JUNIOR, F. B. dos; REIS, V. M.; TEIXEIRA, K. R. dos S. Restrição do 16S-23S DNAr intergênico para avaliação da diversidade de *Azospirillum amazonense* isolado de *Brachiaria* spp. **Pesq. agropec. bras.**, Brasília, vol. 41, n. 3, p. 431-438, 2006.

ROBIN, A.; VANSUYT, G.; HINSINGER, P.; MEYER, J. M.; BRIAT, J. F.; LEMANCEAU, P. Iron dynamics in the rhizosphere: consequences for plant health and nutrition. **Advances in Agronomy**, vol. 99, n. 1, p. 183-225, 2008.

RODRIGUES, H.; FRAGA, R. Phosphate solubilizing bacteria and their role in plant growth promotion. **Biotechnology Advances**, vol. 17, n. 04-05, p. 319-339, 1999.

RODRÍGUEZ-DÍAZ, M.; RODELAS, B.; POZO, C.; MARTÍNEZ-TOLEDO, M. V.; GONZÁLEZ-LÓPEZ, J. A review on the taxonomy and possible screening traits of plant growth promoting rhizobacteria. In: AHMAD, I.; PICHTEL, J.; HAYAT, S. (Ed.). Plant bacteria interactions: strategies and techniques to promote plant growth. Weinheim: **Wiley-VCH**, cap. 4, p. 55-80, 2008.

ROGERS, B. F.; TATE III, R. L. Temporal analysis of the soil microbial community along a toposequence in Pineland soils. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, vol. 33, n. 10, p. 1389-1401, 2001.

ROSADO, A. S.; DUARTE, G. F.; MENDONÇA-HAGLER, L. C. A moderna microbiologia do solo: aplicação de técnicas de biologia molecular. In: SIQUEIRA, J. O.; MOREIRA, F. M. S.; LOPES, A. S.; GUILHERME, L. R. G.; FAQUIN, V.; FRUTINI-NETO, A. E.; CARVALHO, J. G. (Ed.). Inter-relação fertilidade, biologia do solo e nutrição de plantas. Viçosa: **SBCS**, p. 429-448, 1999.

RUSSELLE, M. P.; ENTZ, M. H.; FRANZLUEBBERS, A. J. Reconsidering integrated crop-livestock systems in North America. **Agronomy Journal**, vol. 99, p. 325-334, 2007.

RYDER, M. H.; YAN, Z.; TERRACE, T.E.; ROVIRA, A.D.; TANG, W.; CORREL, R. L. Use of strains of *Bacillus* isolated in China to suppress take-all and rhizoctonia root rot, and promote seedling growth of glasshouse grown wheat in Australian soils. **Soil Biol Biochem**, vol. 31, p. 19–29, 1999

SAITO, M. Can Soil Biodiversity be used for na indicator of soil health? Case studies in Japan. In: **Agricultural Impacts on Soil Erosion and Soil Biodiversity**. 9p., 2004.

SAMBROOK, J.; RUSSELL, D. W. Molecular cloning: a laboratory manual. **Cold Spring Hardor Laboratory Press**, Cold Spring Hardor, New York, 2001.

SANTOS, E. R.; GOUVEIA, E. R.; MARIANO, R. L. R.; SOUTO-MAIOR, A. M. Controle biológico da mancha-aquosa do melão por compostos bioativos produzidos por *Bacillus* spp. **Summa Phytopathol.**, Botucatu, v. 32, n. 4, p. 376-378, 2006.

SILVA, K. R. A.; SALLES, J. F.; SELDIN, L.; ELSAS, J. D. van. Application of a novel *Paenibacillus*-specific PCR-DGGE method and sequence analysis to assess the diversity of *Paenibacillus* spp. in the maize rhizosphere. **Journal of Microbiological Methods**, vol. 54, n. 2, p. 213-231, 2003.

SILVA, L. N. Isolamento de *Bacillus thuringiensis* berliner em amostras de solo do sul do estado do Espírito Santo e seleção a *Anticarsia gemmatalis* (LEPIDOPTERA: NOCTUIDAE). **Dissertação de Mestrado**. Universidade Federal do Espírito Santo, Alegre, 73p., 2008.

SILVA, S. F.; DIAS, J. M. C. S; MONNERAT, R. G. Isolamento, identificação e caracterização entomopatogênica de bacilos de diferentes regiões do Brasil. Brasília: **EMBRAPA: Recursos Genéticos e Biotecnologia**, 4p., 2002.

SILVA, V. N.; SILVA, L. E. S. F.; FIGUEIREDO, M. V. B. Atuação de rizóbios com rizobactérias promotoras de crescimento em plantas na cultura do caupi (*Vigna unguiculata* L. Walp). **Acta Sci. Agron.**, vol. 28, p. 407-412, 2006.

SILVA-WERNECK, J. O; ABREU NETO, F. R. M. V., TOSTES, A. N.; FARIA, L. O.; DIAS, J. M. C. S. Novo isolado de *Bacillus thuringiensis* efetivo contra a lagarta-do-cartucho. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Rio de Janeiro, vol. 35, n. 1, p. 221-227, 2000.

SMITH, D. L.; BLATTNER, F. R.; DAVIES, J. The isolation and partial characterization of a new restriction endonuclease from *Providencia stuartii*. **Nucleic Acids Res**, vol. 3, p. 343-353, 1976.

SOUZA, M. L. Utilização de microrganismos na agricultura. **Biotecnologia**, Piracicaba, n. 21, p. 28-31, 2001.

STERN, M. J.; AMES, G. F. L.; SMITH, N. H.; ROBINSON, E. C.; HIGGINS, C. F. Repetitive extragenic palindromic sequences: a major component of the bacterial genome. **Cell**, vol. 37, p. 1015–1026, 1984.

STRALIOTTO, R.; RUMJANEK, N. G. Aplicação e evolução dos métodos moleculares para o estudo da biodiversidade do rizóbio. Seropédica: Embrapa Agrobiologia, **Documentos**, vol. 93, p. 58, 1999.

SUBBARAO, G. V.; NAKAHARA K.; HURTADO M. P.; ONO, H.; MORETA D. E.; SALCEDO A. F.; YOSHIHASHI A. T.; ISHIKAWA T.; ISHITANI M.; OHNISHI-KAMEYAMA M.; YOSHIDA M.; RONDON M.; RAO I. M.; LASCANO C. E.; BERRY W. L.; ITO O. Evidence for biological nitrification inhibition in *Brachiaria* pastures. **Proceedings of the National Academy of Science**, New York, vol. 106, p. 17302-17307, 2009.

TIEDJE, J. M.; CHO, J. C.; MURRAY, A.; TREVES, D.; XIA, B.; AHOU, J. Soil teeming with life: new frontiers for soil science. In: REES, R. M.; BALL, B. C.; CAMPEBELL, C. D.; WATSON, C. A. (Org.). **Sustainable management of soil organic matter**. Wallingford: CAB International, p. 393-412, 2001.

TORSVIK, V.; ØVREÅS, L. Microbial diversity and function in soil: from genes to ecosystems. **Current Opinion in Microbiology**, Amsterdam, vol. 5, n. 3, p. 240-245, 2002.

TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. Microbiologia. 10 ed. Porto Alegre: **Artmed**, 964p., 2012.

TURNER, J. T.; BLACKMAN, P. A. Factors related to peanut yield increases following *Bacillus subtilis* seed treatment. **Plant Dis**, vol. 75, p. 347-353, 1991.

UTKHEDE, R. S.; LÉVESQUE, C. A.; DINH, D. *Pythium aphanidermatum* root rot in hidroponically grown lettuce and the effect of chemical and biological agents on its control. **Canadian Journal of Plant Pathology**, vol. 22, p. 138-144, 2000.

VALICENTE, F. H.; BARRETO, M. R. *Bacillus thuringiensis* Survey in Brazil: Geographical Distribution and Insecticidal Activity Against *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) (*Lepidoptera*: Noctuidae). **Neotropical Entomology**, Londrina, vol. 32, n. 4, p. 639-644, 2003.

VAL-MORAES S. P.; VALARINI, M. J.; GHINI, R.; LEMOS E. G. M.; CARARETO-ALVES, L. M. Diversidade de bactérias de solo sob vegetação natural e cultivo de hortaliças. **Rev. Ciênc. Agron.**, vol. 40, n. 1, p. 7-16, 2009.

VALVERDE, A.; VELÁZQUES, E.; GUTIÉRREZ, C.; CERVANTES, E. VENTOSA, A.; IGUAL, J. M. *Herbaspirillum lusitanum* sp. nov., a novel nitrogen-fixing bacterium associated with root nodules of *Phaseolus vulgaris*. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, vol. 53, p. 1979-1983, 2003.

VANLOON, L. C.; PAHM, B.; PIETERSE, C. M. J. Systemic resistance induced by rhizosphere bacteria. **Annual Review of Phytopathology**, vol. 36, p. 453-483, 1998.

VENEGAS, F.; SCUDELER, F. Compatibilidade de diferentes cepas de *Rhizobium tropici* com o fungo *Trichoderma harzianum* no tratamento de sementes de feijão (*Phaseolus vulgaris* L.) **Ensaios e Ciência: Ciências Biológicas, Agrárias e da Saúde**, vol. 15, n. 5, p. 19-30, 2011.

VERSALOVIC, J.; SCHNEIDER, M.; de BRUIJN, F. J.; LUPSKI, J. R. Genomic fingerprinting of bacteria using repetitive sequence-based polymerase chain reaction. **Methods in Molecular and Cell Biology**, vol. 5, p. 25-40, 1994.

VINCENT, J. M. Manual for the practical study of root nodule bacteria. **Oxford: Blackwell**, 164p, 1970.

VISWANATHAN, R.; SAMIYAPPAN, R. Role of oxidative enzymes in the plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) mediated induced systemic resistance against *Colletotrichum falcatum* in sugarcane. **Journal of Plant Diseases and Protection**, vol. 109, p. 88-100, 2002.

WALL, G.C.; SANCHEZ, J.L. A biocontrol agent for *Pseudomonas solanacearum*. In: HATMAN, G.L.; HAYWARD, A.C. (Ed.). **Bacterial wilt**. ACIAR Proceeding, p.320-321, 1993.

WATSON, R. J.; SCHIDKRAUT, I.; QIANG, B. Q.; MARTIN, S. M.; LOUIS, P. V. Nde I: a restriction endonuclease from *Neisseria denitrificans* which cleaves DNA at 5'-CATATG-3'. **FEBS Lett.** vol. 150, p. 114-116, 1982

WHIPPS, J.M. Roots and their environment: microbial interactions and biocontrol in the rhizosphere. **Journal of Experimental Botany**, vol. 52, p. 487-511, 2001.

WIDMER, F.; SEIDLER, R. J.; GILLEVET, P. M.; WATRUD, L. S.; DI GIOVANNI, G. D. A highly selective PCR protocol for detecting 16S rRNA genes of the Genus *Pseudomonas* (Sensu Stricto) in environmental samples. **Applied and Environmental Microbiology**, vol. 64, n. 7, p. 2545-2553, 1998.

WU, X. Y.; WALKER, M. J.; HORNITZKY, M.; CHIN, J. Development of a group-specific PCR combined with ARDRA for the identification of *Bacillus* species of environmental significance. **Journal of Microbiological Methods**, vol. 64, n. 1, p. 107-119, 2006.

YANNI, Y. G.; RIZK, R. Y.; CORICH, V. et al. Natural endophytic associations between *Rhizobium leguminosarum* bv. trifolii and rice roots and assessment of its potential to promote rice growth. **Plant and Soil**, v. 194, p. 99-114, 1997.

ZHANG, F.; SMITH, D. L. Genistein accumulation in soybean (*Glycine max* L. Merr.) root systems under suboptimal root zone temperatures. **J Exp Bot**, vol. 47, p. 785-792, 1996.

ZHANG, P.; ZHENG, J.; PAN, G.; ZHANG, X.; LI, L.; ROLF, T. Changes in microbial community structure and function within particle size fractions of a paddy soil under different long-term fertilization treatments from the Tai Lake region, China. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, vol. 58, n. 2, p. 264-270, 2007.

## **ANEXOS**

ANEXO A – Tabela de quantificação do DNA utilizando o equipamento ScanDrop.

ANEXO B - Dendrograma construído a partir de caracterizações morfológicas (FONSECA et al., 2000) de 208 isolados provenientes de áreas sob diferentes manejos, obtido através do BioNumerics.

ANEXO C - Dendrograma construído com 25 isolados obtidos a partir de diferentes manejos de cultivo, obtidos pela análise de agrupamento dos produtos de restrição por ARDRA-PCR, com o algoritmo UPGMA e o coeficiente de Jaccard.

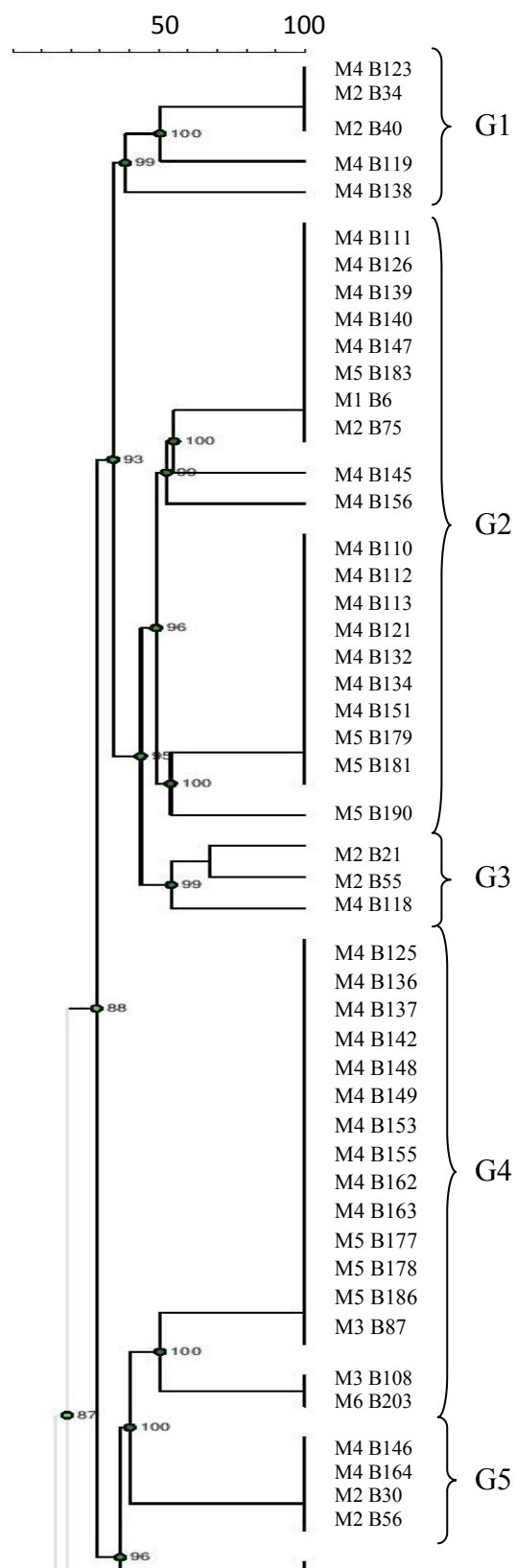
ANEXO D - Dendrograma construído com 25 isolados obtidos a partir de diferentes manejos de cultivo, obtidos pela análise de agrupamento dos produtos ARDRA-morfológico, com o algoritmo UPGMA e o coeficiente de Jaccard.



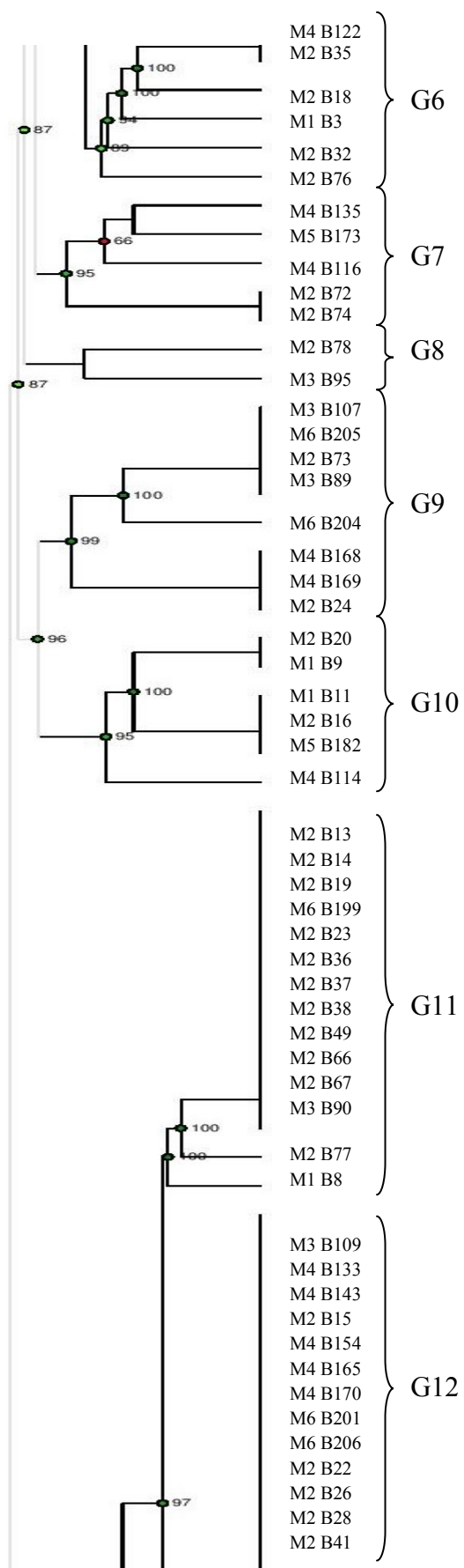
ANEXO A: Tabela de quantificação do DNA utilizando o equipamento ScanDrop.

<b>Amostra</b>	<b>260/280</b>	<b>[DNA] em 0,5 µL</b>	<b>[DNA] em 50µL</b>	<b>Volume de DNA p/ Diluição</b>	<b>Volume de Água p/ Diluição</b>
15	1,9	161	16080	7,773631841	42,22636816
21	2	12,016	1201,6	104,0279627	-54,02796272
25	1,9	261,4	26140	4,781943382	45,21805662
34	1,9	324,13	32413	3,856477339	46,14352266
66	2	147,5165	14751,65	8,473628374	41,52637163
76	1,9	3,653	365,3	342,1845059	-292,1845059
77	1,9	67,887	6788,7	18,41295093	31,58704907
79	1,9	70,632	7063,2	17,69736097	32,30263903
81	1,9	84,444	8444,4	14,80270949	35,19729051
86	2	127,0975	12709,75	9,834969217	40,16503078
108	1,9	174,3	17430	7,171543316	42,82845668
109	1,9	186,441	18644,1	6,704533874	43,29546613
112	1,9	35,4945	3549,45	35,21672372	14,78327628
114	1,9	39,4025	3940,25	31,72387539	18,27612461
116	1,9	38,7615	3876,15	32,248494	17,751506
120	1,8	43,824	4382,4	28,52318364	21,47681636
124	2	38,09	3809	32,81701234	17,18298766
148	1,9	65,518	6551,8	19,07872646	30,92127354
159	1,9	46,97	4697	26,61273153	23,38726847
167	1,8	46,2305	4623,05	27,03842701	22,96157299
170	1,8	61,68	6168	20,26588846	29,73411154
188	1,9	213,954	21395,4	5,842377333	44,15762267
190	1,1	94,996	9499,6	13,15844878	36,84155122
193	1,9	60,067	6006,7	20,81009539	29,18990461
196	1,9	359,3	35930	3,478986919	46,52101308

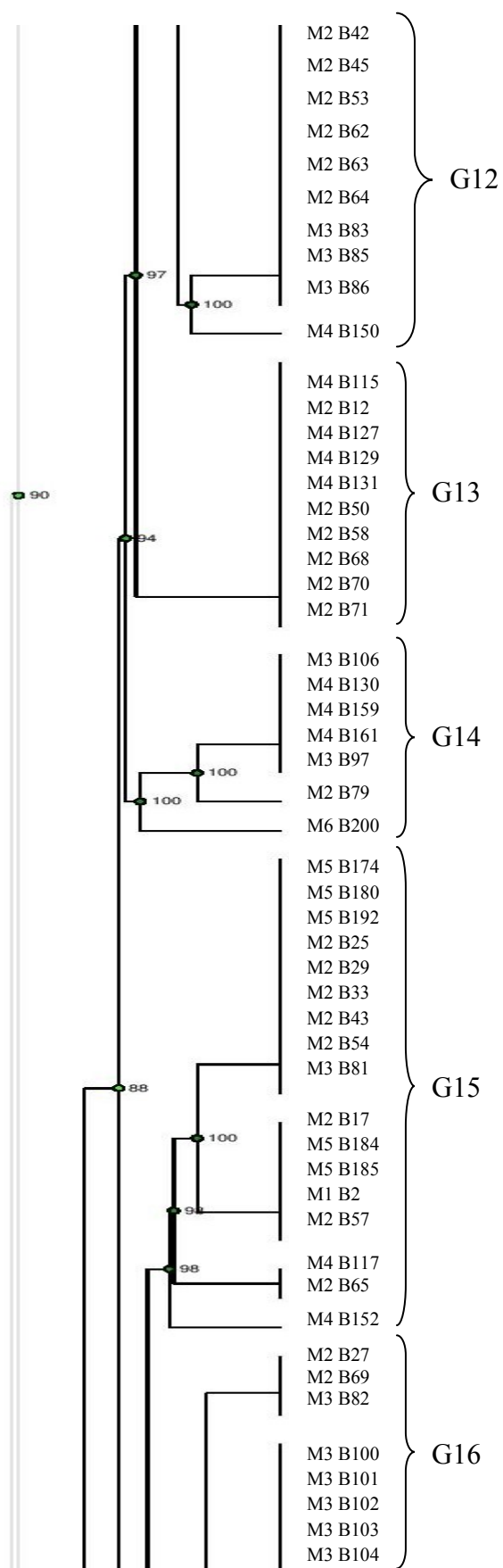
ANEXO B: Dendrograma construído a partir de caracterizações morfológicas (FONSECA et al., 2000) de 208 isolados provenientes de áreas sob diferentes manejos, obtido através do BioNumerics.



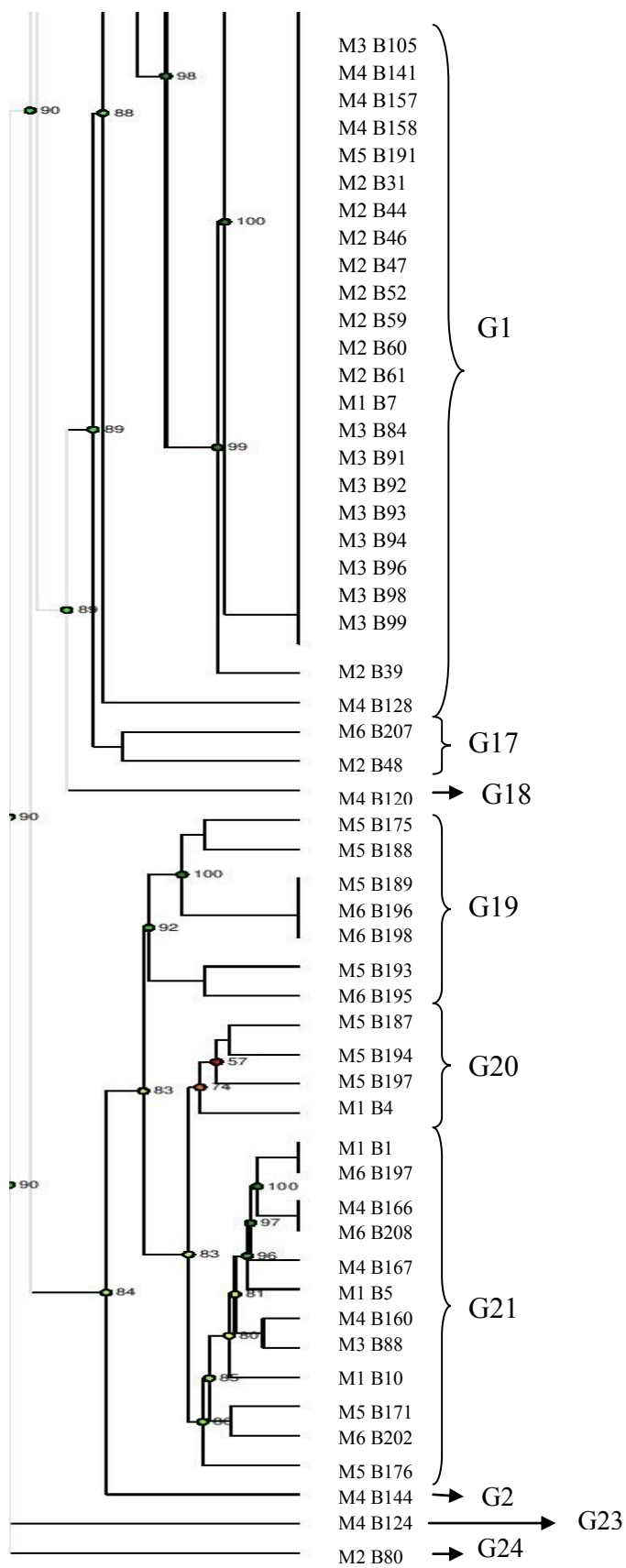
CONTINUA...



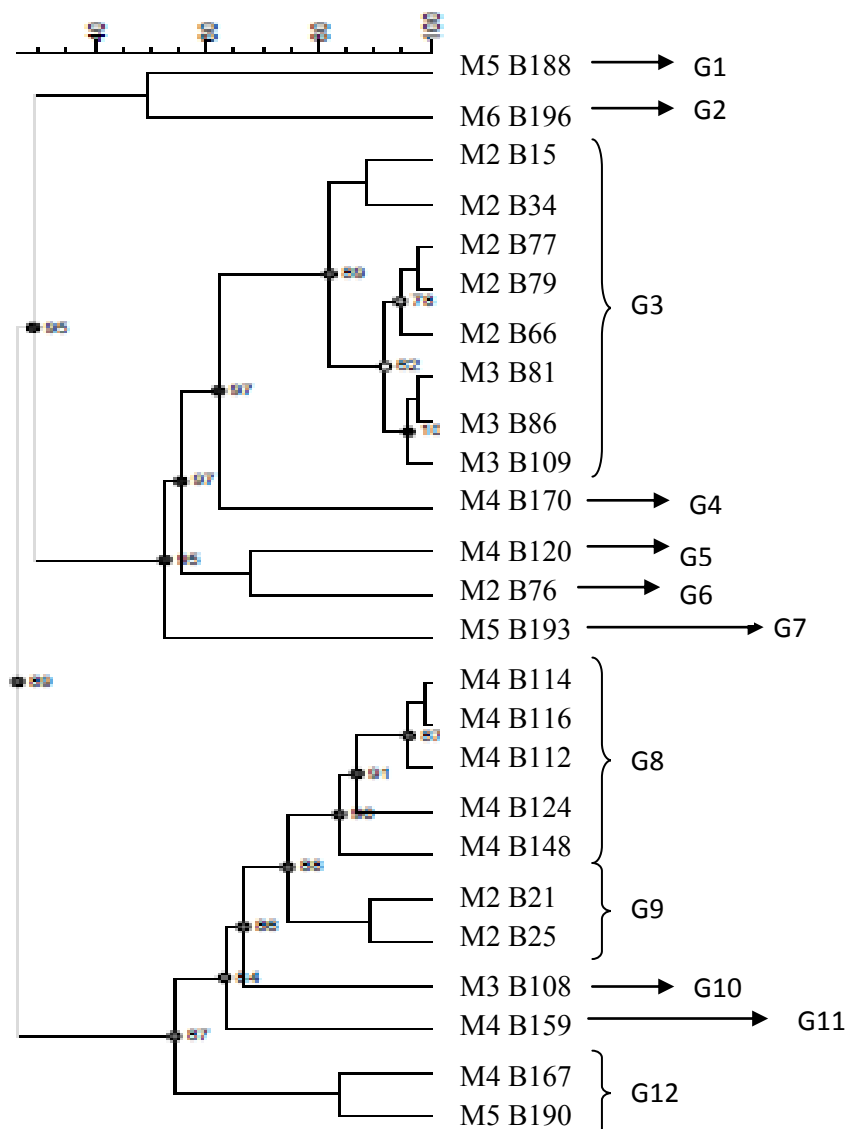
CONTINUA...



CONTINUA...



ANEXO C: Dendrograma construído com 25 isolados obtidos a partir de diferentes manejos de cultivo, obtidos pela análise de agrupamento dos produtos de restrição por ARDRA-PCR, com o algoritmo UPGMA e o coeficiente de Jaccard.



ANEXO D: Dendrograma construído com 25 isolados obtidos a partir de diferentes manejos de cultivo, obtidos pela análise de agrupamento dos produtos ARDRA-morfológico, com o algoritmo UPGMA e o coeficiente de Jaccard.

